

MAYNARA LEONARDI SCHUH MARTINS

**ESTUDO ANATOMOPATOLOGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DOS EFEITOS
DAS FARINHAS DE CHIA E LINHAÇA NO PROCESSO ATROSCLERÓTICO
NA AORTA DE COELHOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA
COM GEMA DE OVO LIOFILIZADO A 0,25%.**

CURITIBA - PR

2016

MAYNARA LEONARDI SCHUH MARTINS

**ESTUDO ANATOMOPATOLOGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DOS EFEITOS
DAS FARINHAS DE CHIA E LINHAÇA NO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO
NA AORTA DE COELHOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA
COM GEMA DE OVO LIOFILIZADO A 0,25%.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Dalton Bertolim
Précoma

CURITIBA - PR

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - *Stricto Sensu*

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos vinte e nove dias do mês de novembro de 2016 as 08h e 00min., realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, “ESTUDO ANATOMOPATOLOGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DOS EFEITOS DAS SEMENTE DE CHIA E LINHAÇA NO PROCESSO ATROSCLERÓTICO NA AORTA DE COELHOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA COM OVO LIOFILIZADO A 0,25%.” apresentado por Maynara Leonardi Schuh para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Dalton Bertolin Précoma - Presidente	
Prof. Dr. Luiz César Guarita (PUCPR)	
Profª. Drª. Ana Cristina Miguez Teixeira (UNIANDRADE)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Dalton Bertolin Précoma

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Luiz César Guarita

Conceito: Aprovado

Profª. Drª. Ana Cristina Miguez Teixeira

Conceito: Aprovado

Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

Corrigir o nome do aluno: acrescentar o sobrenome
“Martins” ao final do nome.

Prof. Dr. Dalton Bertolin Précoma
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits -Filho
Coordenador do PPGCS - PUCPR

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mauro e Lunara pelo exemplo de perseverança, dedicação e comprometimento;

Ao meu irmão Fábio, que sabe dizer exatamente o que é preciso no momento certo;

Ao meu marido, Fernando, que é a pessoa fundamental para toda essa conquista, sem você nada faria sentido e nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e mostrar sempre o caminho certo nas horas incertas. Obrigado Senhor por colocar ao meu lado, pessoas maravilhosas. Obrigado por suprir todas as minhas necessidades, transformando assim, sonhos em realidade.

Aos meus pais e irmão, meu infinito agradecimento. Mesmo à distância, estiveram sempre me apoiando e reforçando a cada dia, que eu seria capaz desta conquista. Obrigada pelo amor incondicional!

Ao meu marido, por ser tão importante na minha vida. Obrigado por estar sempre ao meu lado, me incentivando e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido ao seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

À minha sogra querida, Dona Izamar, que presenciou os momentos de alegria e tristezas. Ao meu sogro, Seu José (em memória), foi uma honra poder conhecê-lo e ouvir suas histórias. Ao meu cunhado Richard que não se opõem um minuto em nos ajudar.

À todos os colegas da linha de pesquisa, em especial aos alunos de TCC, Carlos, Eduardo, Bruno que foram fundamentais em todas as etapas do trabalho, obrigada pela dedicação.

As amigas de mestrado, que se tornaram amigas para o resto da vida, Ana Flávia, pela ajuda em TUDO, não medindo esforços para me auxiliar, sempre presente no que eu precisasse. À Pâmela, que me mostrou a Nutrição de uma forma diferente e assim pude crescer muito com sua ajuda. À Aniely, que apesar de nos conhecermos na metade do trabalho, tivemos a oportunidade de compartilharmos a etapa mais difícil e dolorosa. Conseguimos! Agradeço

imensamente aos seus pais Anabel e Alcidio e seu marido Moisés, por toda ajuda prestada no preparo da ração. Sem vocês, isso não seria possível.

Aos funcionários do Núcleo de pesquisa do Hospital Angelina Caron, com os quais pude passar um ano de aprendizado e evolução. Obrigada Cris.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia, Ana, Marina e Seigo, que estavam sempre abertos para auxiliar em qualquer dúvida existente com os marcadores. À prof. Lúcia que me auxiliou muito no processo de leitura das lâminas e discussão dos resultados. À prof. Márcia por todas as vezes que precisei de novas comparações bioestatísticas.

À todas as professoras de Nutrição da Pontifca Universidade Católica do Paraná, que me ensinaram tudo o que sei sobre essa maravilhosa profissão, em especial à Prof. Louise, exemplo de profissional a ser seguida.

Agradeço a Jasmine Alimentos, por proporcionar toda farinha de chia utilizada neste estudo.

Finalmente, um agradecimento ao meu orientador, Prof. Dalton, que acreditou em meu potencial e me acolheu em sua linha de pesquisa. Pude aprender muito e amadureci como pessoa e profissional. Muito obrigada pela oportunidade.

EPÍGRAFE

*Descobri que para se chegar, onde é que seja, não é preciso dominar a força,
mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer"*

Amyr Klink

RESUMO

No auxílio da prevenção e do desenvolvimento da aterosclerose, os alimentos funcionais, como a linhaça e a chia, tem uma importante função, pois são compostos por ácidos graxos poli insaturados os quais estão relacionados a proteção cardiovascular. Desta forma o objetivo deste trabalho é analisar os efeitos destes alimentos na aterogênese de coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica a 0,25% de gema de ovo liofilizado. Para o experimento, foram utilizados 38 coelhos machos albinos, randomizados conforme a ingestão de dietas por 12 semanas: (G1) Controle, dieta Padrão; (G2) Grupo Hipercolesterolemico, dieta padrão acrescida de 0,25% colesterol de gema de ovo liofilizado; (G3) Grupo Chia, com a dieta do G2, acrescida de Chia triturada, e (G4) Grupo Linhaça, dieta do G2, acrescida de linhaça triturada. Todos os grupos passaram por análises bioquímicas (CT, HDL-c, LDL-c, TG) no início e término do estudo, e imunohistoquímicas (ICAM e TNF-alfa) após eutanásia. Apresentaram elevação de CT nos grupos (G2, G3 e G4) com diferença entre (G1xG3) ($p=0,008$); aumento de HDL-c em G4 (15,79mg/dl para 28,16mg/dl), porém não significativa. Não observou-se redução de LDL-c entre os grupos. A redução de TG foi confirmada no grupo G3(chia) (74,67mg/dl para 34mg/dl) e G4(linhaça) (78,44mg/dl para 22,5mg/dl). O ICAM não apresentou diferença, porém com pequena redução em G3. Nos resultados de TNF α demonstrou-se relevância estatística, observada entre G1xG2 ($p=0,003$); G2xG3 ($p<0,001$) e G2xG4 ($p=0,003$). Houve a diminuição do processo inflamatório no grupo chia e linhaça, através dos resultados do TNF α e redução nos níveis plasmáticos de triglicerídeos no grupo que ingeriu farinha de linhaça, constatando a eficiência deste na prevenção de doenças cardiovasculares.

Palavras-Chave: Linhaça, Chia, aterosclerose, dieta hipercolesterolêmica, coelhos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Comparação entre a composição da farinha de chia e farinha de linhaça

Tabela 02 - Demonstrativo do Delineamento Experimental

Tabela 03 - Peso médio dos animais nos diferentes grupos

Tabela 04 - Valores da média, mediana, desvio padrão e valor de p para Colesterol Total entre os grupos

Tabela 05- Valores de p comparando os grupos dois a dois para CT

Tabela 06- Valores da média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e valor de p para LDL-C entre os grupos

Tabela 07- Valores da média, mediana, desvio padrão e valor de p para HDL-C entre os grupos.

Tabela 08 - Valores da média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e valor de p para TG entre os grupos.

Tabela 09 - Valores de p comparando os grupos dois a dois para TG

Tabela 10. Valores da média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e valor de p para os marcadores de inflamação ICAM-1

Tabela 11. Valores da média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e valor de p para os marcadores de inflamação TNF-alfa

Tabela 22 - Valores de p comparando os grupos dois a dois para TNF-alfa

LISTA DE GRÁFICOS

Grafico 01: Valores médios do níveis de ICAM quando analisada as médias dos pontos das artérias dos animais em cada grupo

Grafico 02: Valores médios de TNF- α no ponto 4 das aortas dos animais em cada grupo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA - ácido α -linolênico

LA - ácido linoleico

VLDL-c - lipoproteína de densidade muito baixa

SDG - lignana secoisolariciresinol

HDL - lipoproteína de alta densidade

LDL- lipoproteína de baixa densidade

LDL -ox - lipoproteína de baixa densidade - oxidada

CT - colesterol total

TG - triglicerídeos

EPA - ácido icosapentaenóico

DHA - ácido docosahexaenóico

PCR - proteína C-reativa

NO - óxido Nítrico

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

EFSA - European Food Safety Authority

HAC - Hospital Angelina Caron

ml- mililitro

PVPI - polivinil pirrolidona iodo

HE - hematoxilina-eosina

TMA - Tissue Microarray

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

p - valor estatístico

G- grupo

G1 - Grupo controle

G2- Grupo Hipercolesterolêmico

G3- Grupo Chia

G4- Grupo Linhaça

LSD - least significant difference

LISTA DE SIMBOLOS

® - marca registrada

% - porcentagem

nº - número

°C - graus celsius

ω 3 - ácido α -linolênico

ω -6 - ácido linoleico

ω -9 - ácido oleico

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO	III
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
EPÍGRAFE	VII
RESUMO.....	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE GRÁFICOS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 ATEROSCLEROSE.....	22
3.2 A FORMAÇÃO DE PLACAS ATEROSCLERÓTICAS	22
3.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	24
3.3.1 Farinha de chia.....	25
3.3.2 Ácido alfa-linolênico.....	27
3.3.3 Fibras.....	28
3.3.4 Compostos fenólicos	29
3.3.5 Farinha de linhaça	29
3.3.6 Lignanas	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 MATERIAIS	32
4.2 METODOLOGIA.....	33
4.2.1 Delineamento experimental	33
4.2.2 Desenho do estudo	35
4.2.3 Ambiente de Experimentação	36
4.2.4 Animais utilizados	36
4.2.5 Preparo da ração suplementar	36

4.2.6 Aferições.....	37
4.3 COLETAS DE AMOSTRAS.....	37
4.3.1.Coletas de sangue.....	37
4.3.2 Análise histológica	38
4.3.3 Análise morfométrica quantitativa.....	39
4.3.4 Análise imunohistoquímica	39
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5. RESULTADOS	43
5.1 PESO DOS ANIMAIS	43
5.2 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS	44
5.2.1 Colesterol Total	44
5.2.2 LDL Colesterol.....	45
5.2.3 HDL Colesterol	46
5.2.4 Triglicerídeos	46
5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	48
5.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	48
6. DISCUSSÃO	54
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
CONCLUSÃO	63
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO

No Brasil as doenças cardiovasculares são uma das mais importantes causas de mortalidade, com 30% de todas as causas de óbito¹. Uma característica destas doenças é a presença da aterosclerose. Em geral, as principais manifestações clínicas, como o acidente vascular cerebral e o infarto do miocárdio, são causados pelo processo aterosclerótico².

Está bem definido que os fatores de risco para aterosclerose são determinados por processos ambientais como hábitos alimentares inadequados, sedentarismo e a obesidade, associados às mudanças no estilo de vida como a cessação do tabagismo e o controle estresse psicoemocional. Todos estes fatores somados à doenças como a dislipidemia, hipertensão arterial e diabetes^{2,3} contribui para a formação da doença aterosclerótica, sendo que o diagnóstico e o tratamento possuem um elevado custo, e por isso, é fundamental o estímulo a práticas de prevenção e retardo da evolução da mesma⁴.

A aterosclerose é uma doença inflamatória, de evolução lenta, que tem o seu início com a disfunção endotelial. Acomete a camada íntima das artérias de médio e grande calibre⁵. Este processo ocorre lentamente ao longo de décadas^{6,7,8,9}.

Para auxiliar no tratamento do desenvolvimento da placa aterosclerótica, muitos alimentos com propriedades funcionais/nutracêuticas têm sido estudados por apresentarem a sua composição, fibras dietéticas, fitoesteróis, ácidos graxos ômega-3, antioxidantes e polifenóis^{10,11}, podendo efetivamente contribuir para a diminuição do processo aterosclerótico. Dentre esses alimentos iremos destacar dois com grande potencial funcional: Farinha de linhaça (*Linun usitatissimum*) e a Farinha de chia (*Salvia hispânica*).

A farinha de linhaça apresenta três componentes com ações importantes: fitoestrógenos (lignana secoisolariciresinol-SDG), fibra solúvel e ácido α -linolênico (α -3), os quais atuam como cardioprotetores^{12,13,14,15,16}. Quando a composição nutricional da farinha de linhaça é analisada, observa-se que é constituída por 41% de gorduras, 28% de fibra dietética, 21% de proteínas, carboidratos,

vitaminas e minerais. A fonte lipídica da linhaça é constituída em 55% por ácidos α -linolênico¹⁷.

Já a farinha de chia é um alimento que reapareceu à pouco tempo. A *Salvia hispanica* L. como é cientificamente chamada é uma planta herbácea anual da família da menta (Labiatae), nativa do sul do México e do Norte da Guatemala¹⁸, seu cultivo foi interrompido no século XVI quando os conquistadores invadiram a América, e alegavam que sua farinha era considerada sacrílega¹⁹. Porém hoje conta com variedades tradicionais ricas em ácidos graxos α -3, e também ricas em ácidos graxos α -6. Sua composição apresenta muitos benefícios para a saúde humana pois contem 30 -35% gordura, 32- 40% fibra, 22 % proteína, 37- 42% carboidrato, antioxidantes, vitaminas e mineiras. Observa-se que a grande constituição da chia é referente a sua fonte lipídica a qual possui entre 60 e 68% de ácidos α -linolênicos, uma concentração maior que a da linhaça, 22% de ácido α - linoléico^{20,21}.

Em estudo realizada por Chicco et al²², 72 ratos foram distribuídos aleatoriamente e alimentados com uma dieta rica em sacarose mais a adição de farinha de chia, e dieta com óleo de milho, durante 5 semanas. Observou-se no experimento um aumento significativo de HDL- colesterol em 66,2% na dieta de chia. Já em relação aos ácidos graxos poli insaturados, observou-se que quando a farinha de chia substituiu o óleo de milho como a fonte de gordura alimentar os níveis séricos do α -3, ALA, EPA e DHA, foram significativamente mais elevados em comparação com aqueles obtidos no grupo de óleo de milho.

Em estudo com 100 indivíduos durante quatro semanas foi avaliado a ingestão das farinhas de chia nos grupos de teste (n = 25) com quantidade de 2,5, 5,0 ou 10,0 g / dia, sendo que o grupo controle recebeu 4,0 g de farinhas de girassol / dia. Como resultado observou-se uma significativa redução da pressão arterial Sistólica no grupo teste em relação com a dieta controle, diminuindo significativamente fibrinogênio e proteína C-reativa (PCR)²³.

Nesses estudos observa-se que os ácidos graxos poli insaturados estão associados com proteção cardiovascular, paralelamente porque promovem uma variedade de ações como: a competição com o ácido araquidônico na formação de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos; a inibição da agregação

plaquetária (efeito antitrombótico) e estimulação da vasodilatação; a produção de efeitos anti inflamatórios e redução da quimiotaxia dos leucócitos²⁴.

Diante dos fatores supracitados é de extrema importância e enriquecimento para o meio científico e do senso comunitário o estudo das propriedades funcionais da farinha de linhaça e da farinha de chia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da farinha da linhaça e da farinha de chia na aterogênese de coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica a 0,25% de gema de ovo liofilizado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Alimentar coelhos com dieta hipercolesterolêmica acrescida com farinha de chia e linhaça e verificar o perfil lipídico dos coelhos que receberam essa dieta.
- Avaliar histologicamente e imunohistoquimicamente as aortas dos quatro grupos estudados.
- Comparar os resultados obtidos com animais alimentados com farinha de chia e linhaça.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, de origem multifatorial, que ocorre em resposta à agressão endotelial ocasionada por vários fatores tais como dislipidemia, hipertensão arterial ou tabagismo. Em geral, acomete principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre¹, formando ateromas. Os ateromas são placas compostas especialmente por lipídeos e tecido fibroso, que se formam na parede dos vasos, estes levam à diminuição progressiva do diâmetro do vaso, podendo chegar a obstrução da luz arterial.

Os principais participantes do processo aterosclerótico incluem endotélio vascular, as células musculares lisas, além das lipoproteínas circulantes.

Alguns fatores de risco, como dislipidemia, hipertensão arterial, o excesso de LDL-C na circulação; a presença de LDL oxidada (LDL-ox) na parede arterial; o ataque dos radicais livres ocasionados pelo tabagismo, diabetes melitos, hipertensão, infecções por microrganismos, entre outros^{25,26}, dão início a disfunção endotelial. Como consequência, a disfunção endotelial leva ao aumento da permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a sua retenção no espaço subendotelial. Já dentro do endotélio essas moléculas de LDL passam a designarem-se LDL-oxidada, tornando-as imunogênicas, levando a uma grande concentração dessa lipoproteína nesse espaço.

3.2 A FORMAÇÃO DE PLACAS ATEROSCLERÓTICAS

Paralelamente ao processo de dano ao endotélio e permeabilidade das lipoproteínas (LDL), existem também o surgimento de alguns mediadores de inflamação estimulado pela presença de LDL oxidado, como as moléculas de adesão leucocitária a citar a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) que atua na adesão de monócitos, macrófagos e plaquetas circulantes no endotélio. Por sua vez e incentivados por proteínas quimiotáticas, os monócitos se transferem para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua

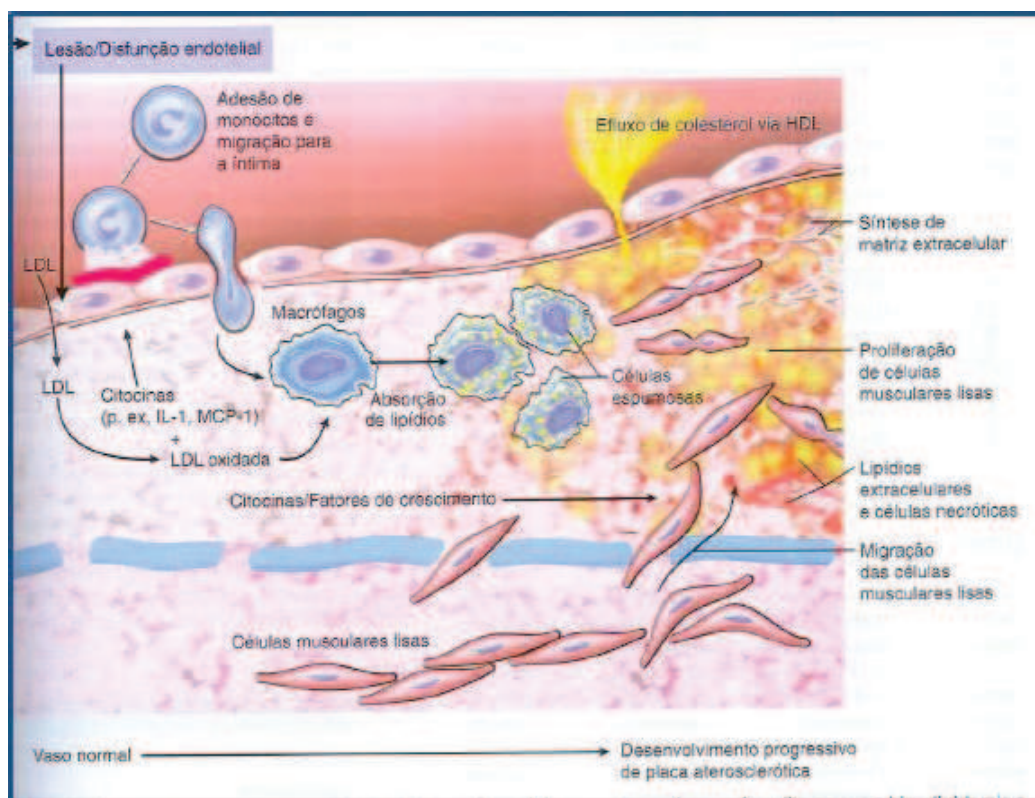
vez captam as LDL oxidadas, sendo assim chamados de células espumosas, transformando-se no principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose².

Aliado a esse processo, as células musculares lisas, através de mediadores da inflamação secretados pelos macrófagos, migram da camada média arterial, para a íntima, passando a produzir citocinas inflamatórias e fatores de crescimento como o fator de necrose tumoral (TNF- α), que tem o papel principal no desencadeamento das cascatas de citocina. Com isso, vale destacar que as moléculas de adesão ICAM e o TNF- α , juntos, são consideradas importantes marcadores inflamatórios da doença aterosclerótica²⁷

Uma placa aterosclerótica totalmente desenvolvida é formada por um núcleo lipídico rico em colesterol e capa fibrosa. As placas ateroscleróticas podem dividir-se em dois grupos distintos: placas estáveis e instáveis. A grande diferença entre elas está no fato das placas estáveis serem constituída principalmente por colágeno, organizado em capa fibrosa espessa e poucas células inflamatórias. Já as placas instáveis apresentam alta atividade inflamatória, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue².

Depois de configurado o dano ao endotélio, as células saturadas de lipídeos se rompem na parede vascular, formando as estrias gordurosas, que por sua vez provocam um remodelamento do vaso, causado pelo espessamento da camada íntima, levando a formação de trombo, conseqüente, a aterotrombose e suas manifestações clínicas^{28,29}.

Figura 1. Formação da placa aterosclerótica



3.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os alimentos funcionais surgiram no Japão, na década de 80, com a finalidade de desenvolver alimentos saudáveis à população que envelhecia, visando também, reduzir gastos com a saúde pública,³⁰ prevenir doenças crônicas degenerativas e com isso, melhorar a qualidade de vida³¹. Inicialmente, inúmeras denominações foram utilizadas para designar esses tipos de alimentos que fornecem proteção à saúde, onde destacam-se os termos "nutracêuticos", "planejados", "saudáveis", "protetores" e "farmacêuticos". Todavia, a denominação que melhor se adequou a esta categoria foi a de "Alimentos Funcionais".

De acordo com Kwak (2001) o "conceito de alimentos funcionais foi adotado mundialmente, pois demonstrava-se que certos alimentos exerciam benefícios fisiológicos além de reduziam o risco de algumas doenças"³².

Desta forma, pode ser considerado alimento funcional os alimentos que exercem efeito metabólico ou fisiológico, contribui para o bem estar físico, reduz o desenvolvimento de doenças, fazendo parte de uma alimentação cotidiana e usual, e assim possuir efeito benéfico e duradouro.^{33,34}

Neste sentido, a portaria nº 398 de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil define como alimento funcional: "todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, sendo consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos a saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica"³⁵.

Esses alimentos são compostos por vários elementos bioativos³⁶. Sendo seus principais ingredientes: a fibra solúvel (aveia), ω -3 (plantas esteróis e ou fitoesteróis), polifenóis (azeite de oliva), isoflavonas (soja) e probióticos, conforme tabela abaixo

Alguns desses alimentos considerados funcionais já estão sendo vendidos no Brasil, e essa indústria apresentou um aumento nas vendas de 81% entre 2004 e 2009³⁷, deste modo é visível a importância de pesquisas que evidenciem seus reais benefícios para a saúde humana.

Tabela 1. Comparação entre a composição da farinha de chia e farinha de linhaça.

FARINHA DE CHIA	FARINHA DE LINHAÇA
Ácido Alfa Linolênico	Ácido Alfa Linolênico
Fibras	Fibras
Polifenóis: ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina e kaempferol	Lignanas

3.3.1 Farinha de chia

A *Salvia hispanica L*, conhecida popularmente por Chia, é uma planta da família das Lamiaceae, nativa do México e da Guatemala, foi um alimento básico importante para mesoamericanos em tempos pré-colombianos sendo consumidas

principalmente pelos maias e astecas para aumentar a resistência física. Nesta época suas farinhas eram utilizadas como alimento na forma de farinha ou farinha, bebida (mistura de farinhas com água ou suco de limão), tinta e também para a medicina³⁸.

Atualmente, a farinha de Chia é comercialmente cultivada no México, Bolívia, Argentina, Equador e Guatemala³⁹. No Brasil, a chia é produzida principalmente nos estados de Rio Grande do Sul e São Paulo. Embora ela não seja um alimento popular, em 2009, foi aprovada como ngema de ovo alimento pelo Parlamento Europeu e pelo Conselho Europeu. No entanto, o Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes, diz que a farinha de chia é classificada como produto sem histórico de uso, ou seja, é coberto por regulamentos técnicos específicos como alimento sem uso ou ngema de ovos ingredientes, por isso não há nenhuma evidência de efeitos adversos ou de alergenicidade causados pela farinha de chia^{40,41}. Porém, seu consumo está aumentando devido às suas propriedades funcionais, seu teor de proteína, óleo, fibras e antioxidantes⁴¹.

Sua composição é principalmente por sua fonte lipídica que apresenta 25-35%, sendo que a porção de ácido α -linolênico (ALA) compreende 60 a 68% de sua concentração, já sua porcentagem de proteína é de 17 a 24%, 37- 42% de carboidrato, e fibra que corresponde com 18 a 22%^{21,38,42} sendo que 30% de fibra é da forma bruta, 56% de fibra dietética total sendo 53% de fibra dietética insolúvel e 1,3% de fibra dietética solúvel⁴³. Segundo alguns estudos, a farinha contém todos os aminoácidos essenciais necessários para a nutrição humana, entretanto, sua composição pode ser alterada conforme o ambiente em que ela seja cultivada, modificando principalmente os níveis de proteína e ácidos graxos⁴⁴. Devido aos polifenóis quercetina, kaemferol⁴⁵, as farinhas de chia possuem um importante papel como antioxidantes em produtos alimentares⁴⁵.

Outra característica importante da farinha de chia é devido a sua elevada quantidade de fibras (solúvel e dietética), possui um poder muito grande de absorção de líquido, e com isso a transforma em gel, ocorrendo também no estômago. Desta forma, esse processo eleva a sensação de saciedade, provendo efeitos positivos em relação ao controle do diabetes, redução da

hipercolesterolemia e muitas vezes ocasionando mudanças benéficas na função intestinal⁴⁵.

Há evidências que o consumo regular de ácidos graxos α -3 previne doenças cardiovasculares, aterosclerose e trombose. Neste contexto diversos estudos apontam que o consumo de chia proporcionou um aumento do HDL (lipoproteína de alta densidade) e diminuiu significativamente o conteúdo de triglicerídeos no plasma sanguíneo dos ratos^{46,47}. As farinhas também melhoram a tolerância a glicose e insulina, reduzem a adiposidade visceral, diminuem a esteatose hepática e reduzem fibrose cardíaca e hepática em ratos⁴⁷.

3.3.2 Ácido alfa-linolênico

Conforme o Departamento de Aterosclerose⁴⁸, ao classificarem as gorduras, devem-se observar o número de duplas ligações covalentes presentes nos seus ácidos graxos, que podem ser saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e até mesmo ramificados.

Os ácidos graxos poli-insaturados são representados pelo ácido α -linolênico (ALA) e ácido α -linoléico (AL). De acordo com Santos (2013)⁴⁹ é sabido que os ácidos graxos poli insaturados promovem redução dos triacilgliceróis plasmáticos pela diminuição da síntese hepática da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-c). Podem ainda, causar efeitos protetores do sistema cardiovascular como: reduzir a viscosidade sanguínea, aumentar o relaxamento endotelial, além de efeitos antiarrítmicos⁴⁹.

Dentro dos ácidos graxos poli insaturados destacamos o ácido α -linolênico (ω -3), sendo este um ácido graxo essencial, que o organismo não produz, por este fator deve ser ingerido e incorporado pela alimentação⁵⁰, fator determinante na redução do risco das Doenças cardiovasculares, pelo fato de alterar a inflamação vascular e a disfunção endotelial⁴⁸.

Estes ácidos graxos ainda apresentam compostos anti inflamatórios pois possuem importantes nutrientes como os compostos fenólicos⁴⁹.

Estudo em que indivíduos hipercolesterolêmicos receberam dieta rica em ácidos graxos poli insaturados, variando entre ALA e AL, demonstrou que a dieta

ALA diminuiu os marcadores inflamatórios e os níveis séricos de CT, LDL-C, TG e HDL-C⁵¹.

Em recente estudo com humanos, um acréscimo de 25 g de farinha de chia por dia em sua dieta durante 7 semanas, demonstrou elevação dos níveis plasmáticos de ácido α -linolênico e ácido eicosapentaenóico⁵².

Estudo anterior que visava avaliar o efeito de dietas contendo linhaça triturada, farelo desengordurado de linhaça, óleo de linhaça e complexo isolado de lignanas (diglicosídeo secoisolariciresinol) no perfil lipídico de coelhos, atribuiu o efeito hipocolesterolêmico da linhaça a presença das fibras alimentares e lignanas⁵³.

3.3.3 Fibras

As fibras são constituídas de celulose, hemicelulose, pectinas, gomas, mucilagens e ligninas. Suas funções são: melhorar o funcionamento do sistema gastrointestinal, favorecendo o trânsito intestinal e atuar contra doenças relacionadas ao intestino; podem diminuir os níveis de colesterol e glicose sanguínea; auxiliam no controle de peso, prgema de ovocando maior sensação de saciedade⁵⁴.

De acordo com Epaminondas (2009)⁵⁵, entende-se por fibra alimentar os polissacarídeos não- amiláceos. Sabe-se que a fibra dietética não é fonte de energia, pois não são sujeitas à hidrólise pelas enzimas do trato digestivo humano, portanto, constituem a parte não digerível do alimento encontrado nos vegetais, verduras, raízes e hortaliças, sendo que a farinha de linhaça é uma grande fonte de fibras alimentares. Podemos destacar a existência de dois tipos de fibras: as solúveis e insolúveis^{54, 56}.

Conforme estudo de Araujo (2000)⁵⁷, ao analisar o ponto de vista nutricional, é recomendado o consumo de ambos os tipos de fibras a fim de proporcionar benefícios à saúde^{57,58}.

As fibras solúveis atuam captando água e formando géis, aumentam a viscosidade do conteúdo gástrico e contribuem com a diminuição da absorção de carboidratos no intestino delgado. Atuam na redução do colesterol sérico, devido à viscosidade da fibra, que diminui a absorção de colesterol pelo intestino⁵⁹. Já as fibras insolúveis tem características que visam promover

melhoras no trânsito intestinal, previnem a constipação, e atuam, prioritariamente no aumento do bolo fecal.

A recomendação de ingestão diária de fibra alimentar deve ser de 20 a 30 g, sendo que destas, 6 g devem ser de fibra solúvel⁶⁰.

3.3.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias formadas por, no mínimo, um anel aromático, em que pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila, encontrado sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, e não na forma livre na natureza⁶¹. São compostos naturais com estrutura semelhante ao colesterol, sua atuação pode ser determinada pela redução de oxigênio singlete, na inibição das reações de oxidação lipídica e na quitação de metais assim como, seqüestrar radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana⁶².

Além disso, apresentam uma ampla gama de propriedades farmacológicas, como anti-alergênicas, anti arteriogênicas, anti inflamatórias, antimicrobianas, anti-trombóticas e também efeitos cardioprotetores e vasodilatadores^{63,64}.

A farinha de chia possui como principais compostos fenólicos, o ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina e kaempferol,⁶⁵ sendo que ela pode ser usada como antioxidante.

3.3.5 Farinha de linhaça

A farinha de linhaça é composta por dois componentes semelhante a farinha de chia: fibra solúvel e ácido α - linolênico, e o que a difere é a presença de fitoestrógenos (lignana secoisolariciresinol-SGD), o que a faz um alimento funcional.^{53,66,67}.

Como características principais a linhaça é uma planta herbácea, pertencente à família Linaceae, tem origem na Ásia, seu nome botânico, *Linum usitatissimum* L., significa “a maior parte comestível”^{17,68,69}. Os primeiros relatos da farinha são datados de 5000 anos antes de Cristo, na Mesopotâmia⁷⁰. É obtida a partir do linho, sendo utilizada para consumo humano e animal. Possui várias aplicações, o óleo é usado pelas indústrias na fabricação de tintas, vernizes e resinas, enquanto o farelo é vendido para fábricas de rações animais.

Sua cor pode variar entre o marrom e o dourado dependendo de onde é cultivada, a marrom em lugares quentes, e a dourada em locais frios, porém isso não interfere em sua composição química e propriedades nutricionais^{55,71}. No Brasil, por exemplo, a linhaça tem seu maior cultivo no Rio Grande do Sul, a cor do grão varia do marrom ao avermelhado^{66,72,73}.

Na alimentação humana recomenda-se que os grãos de linhaça sejam consumidos na forma de farinha, sendo moídos ou triturados, a fim de se obterem reais benefícios à saúde humana⁷⁴. Estes grãos devem também, ser assados, para aumentar a quantidade e qualidade de fibras e proteínas, assim como, eliminar alguns compostos anti nutricionais presentes na farinha, que são eliminados em altas temperaturas^{75,76}. Recomendação para o consumo são fundamentais a porção de 8 g (uma colher de sopa) de farinha de linhaça moída por dia^{77,78}.

Quando analisada a composição nutricional da farinha de linhaça, observa-se que ela é constituída por 41% de gorduras, 28% de fibra dietética, 21% de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais^{56,66,79,80}. Quanto às gorduras, é pobre em gordura saturada (9% do total de ácidos graxos), moderada em gordura monoinsaturada (18%) e rica em gordura poli insaturados (73%)⁸¹. A fonte lipídica da linhaça é constituída em 51-55% por ácidos alfa-linolênicos⁵³. É a fonte mais rica da lignana chamada *diglucosideo secoisolariciresinol* (SGD), contendo cerca de 16,4 mg/g. O nível de SGD pode variar entre 0,6 e 1,8%⁵³.

Seu desempenho funcional está na redução dos níveis de colesterol^{82,83,84} e glicemia⁸⁵, diminuição da resposta inflamatória, efeito cardioprotetor e capacidade de renovação celular⁷²⁻⁸⁶.

Conforme estudos anteriores a farinha de linhaça pode atuar na melhora de diversas patologias como o câncer, diabetes, lúpus, perda óssea, doenças hepáticas, renais e, principalmente as doenças cardiovasculares⁸⁷. Por isso, constata-se que a linhaça, de fato, é uma alternativa segura e relativamente barata para a redução colesterol, contribuindo desta forma para a diminuição dos eventos cardiovasculares⁸⁸.

3.3.6 Lignanas

Os fitoestrógenos são substâncias pertencentes a classes de polifenóis, presentes em algumas plantas. Os principais fitoestrógenos na alimentação são as isoflavonas e as lignanas^{89,90}.

A farinha de linhaça possui alta concentração de lignana em sua casca na forma de SDG, matairesinol, pinioresinol e lariciresinol. As quantidades variam entre 100mg% de grão a cerca de 26% de grão, principalmente a SDG^{91,92,93}.

A partir de matairesinol e secoisolariciresinol (SGD), respectivamente, surgem as duas maiores classes de lignanas (enterolactona e enterodiol) que possuem alta capacidade antioxidante, além de apresentar efeitos positivos na redução das DCV's⁹⁴.

De acordo com Magalhães (2004)¹² as lignanas tem a função de auxiliar a redução do colesterol modulando a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol. Ocorre devido à competição com os receptores intestinais, com isso, as lignanas impedem a ligação do colesterol diminuindo sua absorção no intestino. Já seu efeito antioxidante é devida a redução da oxidação de LDL-C na camada íntima de endotélio e consequentemente inibição do processo aterogênico^{49, 53, 93,95}.

Alguns estudos comprovam a atuação das lignanas⁵³ na redução do estresse oxidativo, diminuição do CT em 20%, LDL-C em 14%, com aumento do HDL-C em 30%, em coelhos alimentados com elevados níveis de colesterol, e ingestão de complexo isolado de lignanas, durante dois meses. Em outro experimento, com a administração de 15mg de SGD por kg de peso, houve redução do desenvolvimento de aterosclerose em 73% das aortas de coelhos. Isso foi atribuído a menor concentração de CT e LDL-C, que reduziram 33 e 35% respectivamente⁸⁷.

Desta forma a lignana presente na linhaça exerce papel protetor em eventos cardiovasculares, principalmente quando existe um consumo de colesterol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Este trabalho compreende um estudo experimental, realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Angelina Caron (HAC), (convênio com a Pós Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR), Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR e pelo Biotério Central da PUCPR. Foram necessários os seguintes materiais e equipamentos:

MATERIAL PERMANENTE: Kit cirúrgico para cirurgia em animal de pequeno porte, balança eletrônica marca Ohaus® Precision Standard modelo TS-2KS com capacidade para 20kg, gaiolas de metal, pranchetas cirúrgicas e microscópio de polarização Olympus® BX40.

MATERIAL DE CONSUMO: Trinta e oito coelhos machos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) da linhagem *New Zealand*; 360 kg (18 sacos) de ração Nuvital®; 45kg (3 sacos) de gema de ovo liofilizado; 30 kg de farinha de linhaça; 30kg de farinha de chia, 38 Bisturis nº11; 38 lâminas para a tricotomia; 38 unidades de fio de náilon 4-0; 06 unidades de fio de algodão não agulhado; 08 unidades de agulha rosa; 38 unidades de agulha verde; 38 unidades de seringa (3ml), 70 unidades de seringa (5ml); 06 frascos de PVPI (polivinil pirrolidona iodo); 20 pacotes de gazes; 02 caixas de luvas de procedimentos; 01 caixa de máscaras para procedimentos; 06 frascos de formalina a 10%; 01 frasco de álcool a 95%; 38 frascos com tampa (para conservar peças cirúrgicas); corante Hematoxilina-eosina; 32 lâminas e lamínulas; 04 frascos de quetamina (1ml/50mg); 08 frascos de xilazina (1ml/20mg); marcadores para a imunohistoquímica; reagentes e kit para dosagens do perfil lipídico.

Os materiais permanentes foram disponibilizados pelos laboratórios e os de consumo, foram adquiridos pelos pesquisadores para a realização do experimento.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Delineamento experimental

O estudo experimental foi realizado após aprovação do projeto pelo protocolo número 720/2012 pela Comissão Ética em Pesquisa Animal da PUCPR (Anexo 01).

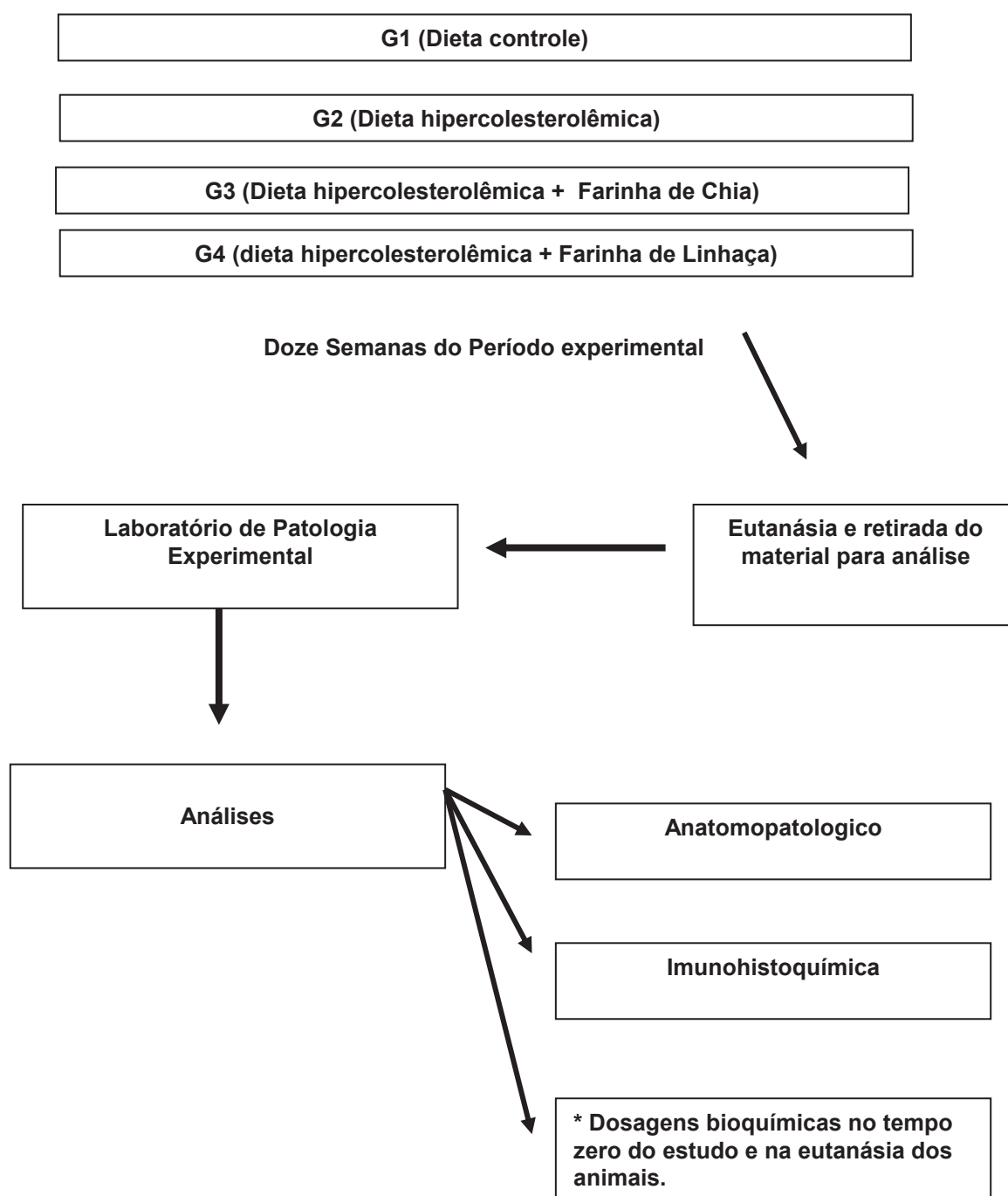
O período do estudo foi de doze semanas, totalizando oitenta e quatro dias. Os animais foram randomizados aleatoriamente em quatro grupos, com um animal em cada gaiola, conforme o tratamento dietético recebido. O grupo Controle G1 (dez animais), recebeu nas doze semanas de experimento a dieta padrão para coelhos (Nuvital®). O grupo Hipercolesterolêmico G2 (dez animais), recebeu nas doze semanas dieta padrão para coelhos (Nuvital®) acrescida com 0,25% de colesterol proveniente do gema de gema de ovo liofilizado. O grupo G3 (nove animais) recebeu nas doze semanas de experimento a dieta padrão para coelhos (Nuvital®) acrescida com 0,25% de colesterol proveniente da gema de gema de ovo liofilizado e 8 g/kg de peso/coelho de farinha de chia triturada. O grupo G4 (nove animais) recebeu nas doze semanas de experimento a dieta padrão para coelhos (Nuvital®) acrescida à 0,25% de colesterol proveniente do gema de ovo liofilizado e 8 g/kg de peso/coelho de farinha de linhaça triturada. A adição de gema de ovo liofilizado tem sido utilizada nos protocolos experimentais de nossa linha de pesquisa para a indução e formação das lesões ateroscleróticas. Neste experimento foram utilizados 0,25% de gema de ovo liofilizado na ração dos coelhos.

Foram organizados quatro grupos de coelhos identificados conforme a Tabela 02.

Tabela 2. Demonstrativo do Delineamento Experimental

Grupos	Procedimentos
G1 (n=10) -dieta padrão Nuvital	Ração padrão Nuvital® para coelhos por 12 semanas.
G2 (n=10) - 0,25 % de colesterol	Ração acrescida de gema de ovo em pó a 0,25% de colesterol por 12 semanas para indução de lesão aterosclerótica em aortas.
G3 (n=9) – 0,25% de colesterol + farinha de chia	Ração acrescida de gema de ovo em pó a 0,25% de colesterol por 12 semanas, juntamente com a farinha de chia à 8g/kg de peso/coelho.
G4 (n=9) – 0,25% de colesterol + farinha de linhaça	Ração acrescida de gema de ovo em pó a 0,25% de colesterol por 12 semanas, juntamente com a farinha de linhaça à 8g/kg de peso/coelho.

4.2.2 Desenho do estudo



4.2.3 Ambiente de Experimentação

Os coelhos foram mantidos no biotério central da PUCPR em macro-ambiente com ciclos de iluminação 12/12 horas, com trocas de ar e temperatura controlada de 19 a 23°C.

Para o micro-ambiente foram utilizadas gaiolas de metal, forradas com cepilho de madeira, higienizadas diariamente. Os animais receberam, durante o experimento, água e ração (Nuvital®) específica para a cada grupo. Cada animal foi mantido em uma gaiola individual, higienizadas diariamente e identificados com uma numeração sequencial na orelha direita, que foi repetida na face frontal da gaiola correspondente.

4.2.4 Animais utilizados

Para a realização do experimento foram selecionados 40 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) da linhagem New Zealand, pesando aproximadamente 1,5Kg e a média das idades foi de quatro meses. O cálculo do tamanho da amostra foi feito com base no estudo de Prim et al (2012)⁸³. Com o propósito de detectar uma diferença mínima de 10% na redução do colesterol entre os quatro grupos de coelhos, considerando-se um nível de significância de 5% e um poder de teste de 90% foi necessária a quantidade de animais utilizados (no mínimo dez coelhos em cada grupo).

4.2.5 Preparo da ração suplementar

Para a alimentação dos coelhos foi preparada uma dieta hipercolesterolêmica ofertada durante todo o experimento nos grupos G2, G3 e G4 em uma proporção de 0,25% de gema de ovo liofilizado, objetivando induzir lesões ateroscleróticas nas aortas dos animais. Assim, para os grupos G2, G3 e G4 foram pesado para cada grupo 5 kg de ração padrão Nuvital® moída, acrescida com 1800 gramas de gema de ovo em pó. A diluição do gema de ovo

em pó foi realizada na seguinte proporção: 1800 gramas de gema de ovo em pó em 2000 ml de água

O preparo da linhaça e da chia foi realizado a partir de 8 g/kg/coelho, através da moagem das farinhas em liquidificador e armazenamento sobre refrigeração, sendo adicionados na ração correspondente: chia (G3) e linhaça (G4).

Ao final, a ração do grupo G2 era acrescida da diluição do gema de ovo liofilizado, em seguida essa mistura era passada em moedor de carne industrial PCP-22LR-N Boca 10 da marca Poli®. Já os grupos G3 e G4, a mistura citada anteriormente foi acrescida de chia e linhaça triturada, respectivamente. Todos os grupos receberam 2 litros de água para dar liga a mistura. Após moagem da mistura pelo moedor de carne, a ração foi peletizada novamente e os pelets foram aquecidos em forno elétrico durante 10 min em temperatura de 180°C.

A ração preparada foi colocada em recipiente plano e largo e armazenada sobre refrigeração.

4.2.6 Aferições

O peso dos animais também foram aferidos e registrados uma vez por semana. Para a coleta de peso utilizou-se uma balança digital disponível no biotério central da PUCPR.

4.3 COLETAS DE AMOSTRAS

4.3.1. Coletas de sangue

Foram coletadas amostras biológicas de sangue de cada coelho para análise bioquímica do colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e triglicerídeos (TG). O processo de punção iniciou com a anestesia dos animais. Para realizar a anestesia em coelhos, assim como Précoma et al. (2006)⁹⁶ e Alessi et al. (2008)⁹⁷, utilizamos xilazina (Coopazine®-Coopers) e a ketamina (Vetanarcol®-König), associados

na dose de 5 mg/Kg e 30 mg/Kg, respectivamente, por via intramuscular na região da coxa. Após 5 minutos, colocou-se o animal em decúbito lateral esquerdo para palpação do processo xifoide, em seguida a palpação cardíaca foi realizada a punção intracardíaca com seringa de 5 ml, com a ajuda do responsável pelo Biotério no tempo zero do estudo e no período pré-operatório ao dia da eutanásia, respeitando um jejum de 12 horas antecedentes ao exame. As dosagens bioquímicas foram realizadas por laboratório terceirizado, de acordo com o método enzimático automatizado. O equipamento utilizado foi o Advia 1200 e a marca dos kits utilizados foi Advia (Siemens).

4.3.2 Análise histológica

Para a realização da análise histológica, a identificação dos animais por grupos foi substituída por números sequenciais com o propósito de obter uma análise cega. Foram analisados do número 01 ao 38, sem saber a quais grupos pertenciam cada artéria. Depois de fixadas em formalina por 24 horas, as peças cirúrgicas foram retiradas dos frascos e processadas para a confecção dos cortes histológicos. Para tal procedimento foram realizados cortes transversais, com 2 a 3 mm de espessura cada, da artéria total de todos os animais do estudo. As amostras foram colocadas em cápsulas histológicas identificadas.

As amostras previamente identificadas foram colocadas no autotécnico (Leica® modelo RM2145), para processamento *overnight*, sendo desidratadas em concentrações diferentes e crescentes de álcool etílico a 70%, 80% e 90%, posteriormente foram diafanizadas em xilol contendo misturas sequencialmente concentradas de parafina durante 12 horas. Como procedimento padrão para a obtenção dos blocos foi realizado a inclusão em parafina quente (Leica® modelo EG1160).

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica® modelo RM 2145), em cortes de 5 µm cada um, dispostos em lâmina de vidro com 75X25mm.

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e elástica (orceína), conforme técnicas convencionais e montadas com bálsamo e lamínula de vidro de 24X50 mm. Para a identificação das lâminas histológicas, utilizou-se o mesmo processo empregado nos blocos histológicos.

Essa leitura permitiu examinar de forma qualitativa o grau de lesão aterosclerótica nos segmentos aórticos removidos. Foram definidos criteriosamente a utilização de 4 pontos da aorta para a análise morfométrica e imunohistoquímica, devido ao baixo grau de lesão dos cortes.

4.3.3 Análise morfométrica quantitativa

A leitura morfométrica não foi realizada pois o grau de lesão encontrado não foi capaz de determinar a camada média da aorta dos coelhos dos quatro grupos.

4.3.4 Análise imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica foi necessária a realização da técnica de *Tissue Microarray* (TMA). Esta consiste em reunir inúmeros fragmentes de tecidos muito pequenos, onde cada fragmento pode ser extraído de diferentes blocos doadores e todos são transferidos para um único bloco, chamado de receptor, formando assim um ngema de ovo bloco de parafina. Isso permite a leitura de várias lâminas em apenas um bloco, minimizando possíveis erros experimentais causados por circunstâncias diferentes entre as técnicas histológicas.

Nesta análise foi construído um bloco com quatro pontos da aorta, selecionando sempre o segundo, os dois do meio e o antepenúltimo ponto. Estes cortes foram determinados pela leitura histológica na coloração de HE.

a) Construção do bloco de *Tissue Microarray* (TMA)

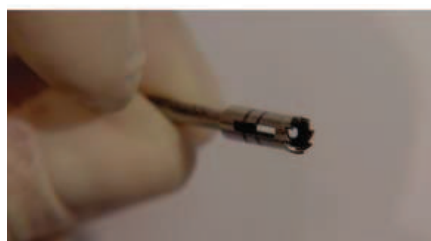
Os blocos parafinados comuns de cada coelho receberam a denominação de blocos doadores. Nas lâminas coradas em HE foram localizadas as amostras arteriais contendo a região de interesse para a construção do TMA.

A metodologia empregada consistiu na utilização de um motor elétrico (modelo Smart – VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda®, São Paulo, Brasil) e uma broca trefina para osso de aço inoxidável de 3.0 mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil) (Figuras 1 e 2).

Figura 2. Motor elétrico



Figura 3. Broca trefina de aço inoxidável



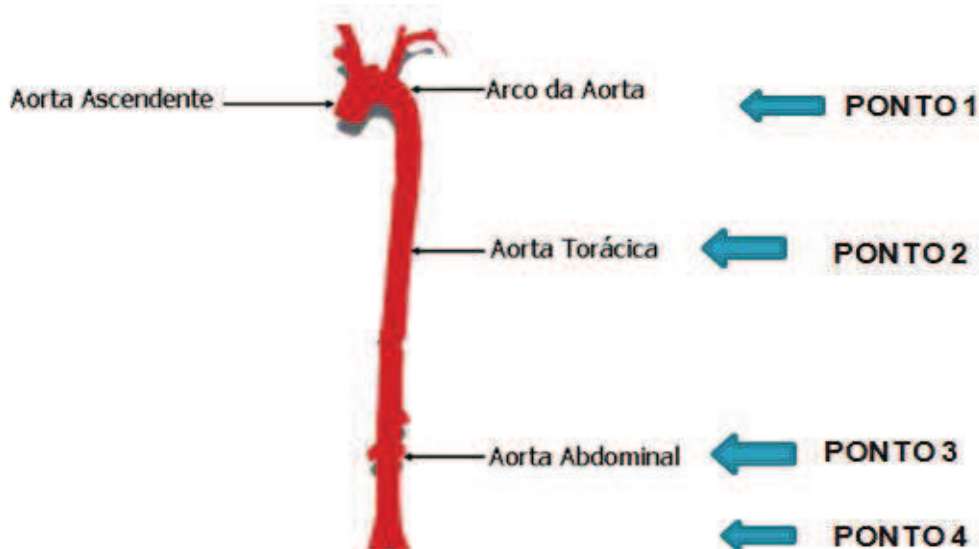
Para que as aortas fossem devidamente localizadas conforme sua identificação individual foi confeccionado um mapa que serviu de apoio. O mapa segue o estilo de um plano cartesiano, onde as colunas são identificadas com letras e as linhas com números. Cada ramo aórtico de cada amostra, resultou em quatro pontos, os quais receberam a identificação de um número mais uma letra (Ex: 1A; 1B; 1C; 1D) (figura 03). Para o último fragmento foi utilizado um marcador, ou seja, foi utilizado o fragmento de outro tecido.

Figura 04 – Mapa que orienta a confecção do bloco receptor

Bloco 1	
Coelho 01=	Ponto A;B;C;D
Coelho 02 =	Ponto A;B;C;D
Coelho 03 =	Ponto A;B;C;D
Coelho 04=	Ponto A;B;C;D
Coelho 05=	Ponto A;B;C;D
Coelho 06=	Ponto A;B;C;D
Coelho 07=	Ponto A;B;C;D
Coelho 08=	Ponto A;B;C;D
Coelho 09=	Ponto A;B;C;D
Coelho 10=	Ponto A;B;C;D
D4 =	Marcador

O bloco-receptor foi confeccionado, através dos seguintes passos:

1) Observação dos quatro pontos a serem retirados



2) Introdução da broca trefina na área demarcada

3) Acionamento do motor elétrico

5) Retirada do fragmento contido na broca trefina e colocado na caixa que auxilia a montagem do bloco conforme o mapa.

Depois de retirados os fragmentos de todos os blocos doadores, e organizados conforme o mapa, montaram-se os ngema de ovos blocos. Ao todo foram montados sete ngema de ovos blocos contendo ambos os quatro cortes pré determinados. Após a finalização do bloco-receptor, foram confeccionadas as lâminas para a análise imunohistoquímica.

b) Técnica de imunohistoquímica

Estes cortes histológicos foram fixados em lâminas de vidro silanizadas e inicialmente submetidos à desparafinização com xilol quente (37°C), desidratação com banhos sucessivos de álcool e reidratação com água. Utilizou-se o álcool metílico e H_2O_2 para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e a água destilada e H_2O_2 para o segundo bloqueio.

Procedeu-se a incubação com os anticorpos monoclonais ICAM, durante 1 hora e do anticorpo monoclonal TNF-alfa. Para a revelação, foi adicionado complexo DAB (Dakocytomation), substrato sobre as lâminas e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer's, seguida de desidratação com banhos de álcool etílico 100% e da clarificação com xilol. Para a montagem das lâminas foi utilizado o Bálsamo do Canadá. O protocolo desenvolvido e descrito acima já foi padronizado no laboratório de patologia. Foram utilizados, controles positivos e negativos para cada reação.

Após as lâminas estarem finalizadas, essas passaram pelo Scanner (Modelo Axio Scan Z1, Marca Zeiss) onde cada corte histológico da aorta foi digitalizado e transformado em fotos. Todas as fotos foram encaminhadas para o programa Photoshop SC 6.0, onde ocorreu a seleção das mesmas, sendo que as desfocadas ou em branco foram ignoradas. Após essas seleção, a quantificação das imagens foi realizada através do programa Pro Image-plus® v.4,5 para Windows®. As áreas positivas para os anticorpos foram marcadas pela coloração castanha e as negativas pela coloração azul, caracterizando, assim, a utilização do método da morfometria de cores. As medidas foram transferidas para o programa Excel for Windows®.

Os dados organizados em uma planilha do programa Excel (peso, perfil lipídico e imunohistoquímica), foram encaminhados para a análise estatística

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas que atenderam esta condição, foi considerado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator e o teste LSD (least significant difference) para as comparações múltiplas (post-hoc). Variáveis que não atenderam a condição de normalidade foram analisadas usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0.

5. RESULTADOS

Durante o processo de alimentação dos animais, dois óbitos ocorreram, um durante a sétima semana (grupo 3) e um na décima segunda semana (grupo 4), portanto, a amostra consistiu em 38 coelhos.

5.1 PESO DOS ANIMAIS

A análise do ritmo de ganho de peso dos coelhos se observa através da tabela abaixo (tabela 03), onde apresenta peso inicial, final e também diferença entre eles. Constatou-se não houve diferença estatística entre os grupos analisados.

Tabela 03 - Peso médio dos animais nos diferentes grupos.

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p*
Peso - inicial (kg)	Controle	10	3,13	±0,54	0,570
	Colesterol	10	3,33	±0,50	
	Linhaça	9	3,37	±0,60	
	Chia	9	3,11	±0,26	
Peso - final (kg)	Controle	10	3,68	±0,44	0,571
	Colesterol	10	3,66	±0,33	
	Após 12 semanas	9	3,57	±0,48	
	Chia	9	3,45	±0,26	
Diferença (final-inicial) (kg)	Controle	10	0,55	±0,40	0,157
	Colesterol	10	0,34	±0,36	
	Linhaça	9	0,20	±0,23	
	Chia	9	0,34	±0,32	

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

5.2 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS

5.2.1 Colesterol Total

Nos níveis de colesterol total basal observa-se que houve um aumento nos níveis séricos de colesterol total em todos os grupos que receberam dieta acrescida de gema de ovo liofilizado (Tabela 03), porém o grupo G4 que ingeriu linhaça aliada a dieta hipercolesterolêmica obteve menor aumento. G1 que recebeu dieta padrão, apontou diminuição nos resultados (35,6mg/dl para 23,64mg/dl). Destaca-se a diferença estatística final e inicial e final entre os grupos G1xG2(p=0,015); G1xG3 (p=0,008) e G1xG4 (p=0,014)

Tabela 04 - Valores da média, desvio padrão e valor de p para Colesterol Total entre os grupos.

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p*
CT - inicial	Controle	10	35,60	±15,13	0,308
	Colesterol	10	24,60	± 9,51	
	Farinha de Linhaça	9	28,33	±13,51	
	Farinha de Chia	9	27,44	±12,02	
CT - final	Controle	10	23,64	±15,72	0,139
	Colesterol	10	62,09	±100,23	
	Farinha de Linhaça	8	36,21	±17,32	
	Farinha de Chia	9	47,64	±46,11	
Diferença (final-inicial)	Controle	10	-11,96	±12,50	0,029
	Colesterol	10	37,49	±97,79	
	Farinha de Linhaça	9	3,86	±10,83	
	Farinha de Chia	9	20,20	±51,00	

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05

Destaca-se na tabela 05 os valores de p das comparações dos grupos dois a dois para as variáveis em que foi encontrada diferença significativa entre os grupos.

Tabela 05 - Valores de p comparando final e inicial dos grupos dois a dois para CT.

Grupos comparados	Valor de p
	Diferença (final-inicial)
Controle x colesterol	0,015
Controle x Farinha de linhaça	0,014
Controle x Farinha de chia	0,008
Colesterol x Farinha de linhaça	0,914
Colesterol x Farinha de chia	0,738
Farinha de Linhaça x Farinha de chia	0,826

LSD (*least significant difference*), $p < 0,05$

5.2.2 LDL Colesterol

Os resultados para os níveis de LDL-C estão apresentados e percebe-se que não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 06 - Valores da média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e valor de p para LDL-C entre os grupos

Variável	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
LDL - inicial	Controle	10	8,64	2,90	18,10	±5,61	0,326
	Colesterol	10	7,83	1,20	27,10	±7,60	
	F.Linhaça	9	11,92	4,50	27,30	±7,94	
	F. Chia	9	15,26	2,70	50,00	±14,63	
LDL - final	Controle	10	21,57	3,90	81,00	±21,49	0,163
	Colesterol	10	90,09	7,50	348,00	±123,47	
	F.Linhaça	8	26,95	2,40	93,00	±29,82	
	F. Chia	9	42,26	5,20	143,10	±41,30	
Diferença (final-inicial)	Controle	10	12,93	-5,70	63,50	±19,71	0,137
	Colesterol	10	82,26	4,90	341,80	±124,45	
	F.Linhaça	9	12,03	-27,30	79,40	±30,61	
	F.Chia	9	27,00	-34,50	128,90	±44,09	

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

5.2.3 HDL Colesterol

Em relação ao HDL-C não houve diferença significativa ao final do experimento entre os grupos e também na diferença entre inicial e final. Observa-se apenas uma redução de HDL-C no grupo G3 (chia) porém não significativa. (tabela 07)

Tabela 07 - Valores da média, mediana, desvio padrão e valor de p para HDL-C entre os grupos.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Valor de p*
HDL - inicial	Controle	10	19,29	16,45	8,60	0,600
	Colesterol	10	17,15	17,70	5,78	
	Linhaça	9	15,79	13,40	8,35	
	Chia	9	21,01	16,70	14,39	
HDL - final	Controle	10	21,55	22,50	12,80	0,288
	Colesterol	10	48,76	25,65	85,99	
	F.Linhaça	8	28,16	26,25	17,71	
	F.Chia	9	14,66	17,70	8,77	
Diferença (final-inicial)	Controle	10	2,26	-2,15	10,39	0,107
	Colesterol	10	31,61	9,00	87,50	
	F. Linhaça	9	9,24	8,00	17,48	
	F.Chia	9	-6,36	-5,90	11,36	

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

5.2.4 Triglicerídeos

Quanto aos triglicerídeos seus resultados apresentam-se na tabela 08, demonstrando uma diferença significativa ao final do experimento e também na diferença entre inicial e final. Observa-se que o TG diminuiu nos grupos que receberam a dieta adicionada de linhaça e chia. Os valores médios, mínimos, máximos, medianos e desvio padrão do TG dos animais estão na tabela 08.

Tabela 08 - Valores da média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e valor de p para TG entre os grupos.

Variável	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Triglic - inicial	Controle	10	65,30	36,00	206,00	±50,87	0,312
	Colesterol	10	59,50	25,00	146,00	±32,74	
	Linhaça	9	79,44	32,00	149,00	±38,20	
	Chia	9	74,67	48,00	152,00	±33,77	
Triglic - final	Controle	10	67,50	7,00	228,00	±63,27	0,049
	Colesterol	10	64,60	20,00	204,00	±53,31	
	F.Linhaça	8	22,50	11,00	53,00	±15,26	
	F.Chia	9	34,00	5,00	101,00	±31,14	
Diferença (final-inicial)	Controle	10	2,20	-56,00	47,00	±33,98	0,022
	Colesterol	10	5,10	-98,00	148,00	±66,92	
	F.Linhaça	9	-59,44	-149,00	16,00	±48,12	
	F.Chia	9	-40,67	-136,00	42,00	±52,27	

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

Na tabela 09, quando comparados os grupos dois a dois percebe-se que a diferença estatística do TG está entre G1xG4 (controle e Linhaça); G2xG4 (hiper e Linhaça), na diferença inicial e final.

Tabela 09 - Valores de p comparando os grupos dois a dois para TG

Grupos comparados	Valor de p	
	Triglic - final	Diferença (final-inicial)
Controle x colesterol	0,673	0,841
Controle x F.linhaça	0,032	0,007
Controle x F.chia	0,142	0,047
Colesterol x F.linhaça	0,013	0,011
Colesterol x F.chia	0,064	0,071
F.Linhaça x F.chia	0,454	0,427

LSD (*least significant difference*), $p < 0,05$

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Através da análise histológica pode-se avaliar o grau de lesões ateroscleróticas presentes nas aortas dos coelhos nos quatro grupos estudados. Analisou-se todos os cortes de cada aorta para cada coelho. Desta forma, foi possível encontrar a carga aterosclerótica de cada aorta, ou seja, verificar qual o grau de lesão mais frequente em cada coelho.

Todas as lesões encontradas variaram do grau 0 ao grau II, sendo que comparação do grau de lesões entre os grupos foram semelhantes. Macroscopicamente não foram visualizadas lesões em nenhuma das 38 peças retiradas. Devido a inexistência de lesões mais acentuadas, o aspecto macroscópico foi similar entre todos os grupos.

A análise morfométrica não foi conclusiva em nenhum aspecto haja vista que não foi possível determinar a camada média das artérias estudadas. Além disso, a análise histológica não apresentou resultados que pudessem classificar os graus de lesão aterosclerótica das peças cirúrgicas.

5.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

O estudo imunohistoquímico avaliou a presença da molécula de adesão intercelular (ICAM) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), nos quatro pontos pré determinados das peças histológicas.

A tabela 10 apresenta os resultados das análises do marcador inflamatório ICAM, na qual demonstra a ocorrência de análise estatística não significativa.

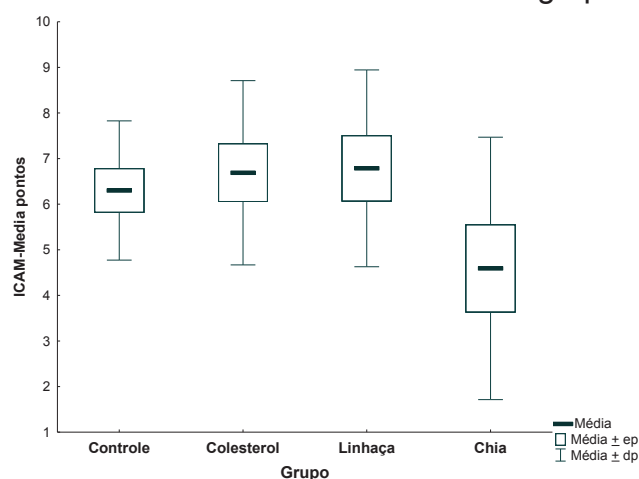
Tabela 10. Valores da média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e valor de p para os marcadores de inflamação ICAM-1

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
ICAM -Ponto 1	Controle	10	5,32	4,73	2,74	7,40	±1,67	0,562
	Colesterol	10	6,29	6,44	3,02	9,20	±2,16	
	Linhaça	9	6,47	5,54	3,71	12,59	±2,79	
	Chia	9	5,10	5,74	0,86	10,15	±3,26	
ICAM-Ponto 2	Controle	10	6,38	6,19	3,77	9,62	±2,11	0,074
	Colesterol	10	6,29	5,57	4,43	10,64	±1,98	
	Linhaça	9	7,77	8,06	2,49	13,17	±3,45	
	Chia	9	4,39	2,50	1,07	7,70	±2,81	
ICAM-Ponto 3	Controle	10	7,22	6,95	4,46	12,05	±2,38	0,239
	Colesterol	9	6,22	6,20	4,03	8,13	±1,61	
	Linhaça	9	7,05	7,41	3,96	11,97	±2,66	
	Chia	9	4,88	3,94	1,44	11,08	±3,67	
ICAM-Ponto 4	Controle	9	6,40	6,01	4,00	8,96	±1,75	0,101
	Colesterol	9	8,12	5,95	4,29	22,70	±5,72	
	Linhaça	9	5,85	5,26	4,12	9,31	±1,82	
	Chia	9	4,00	3,42	1,32	9,05	±2,66	
ICAM-Media pontos	Controle	10	6,30	5,78	3,98	8,57	±1,53	0,131
	Colesterol	10	6,69	6,37	4,66	11,73	±2,02	
	Linhaça	9	6,79	6,04	4,63	11,37	±2,16	
	Chia	9	4,59	3,99	1,80	9,46	±2,88	

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

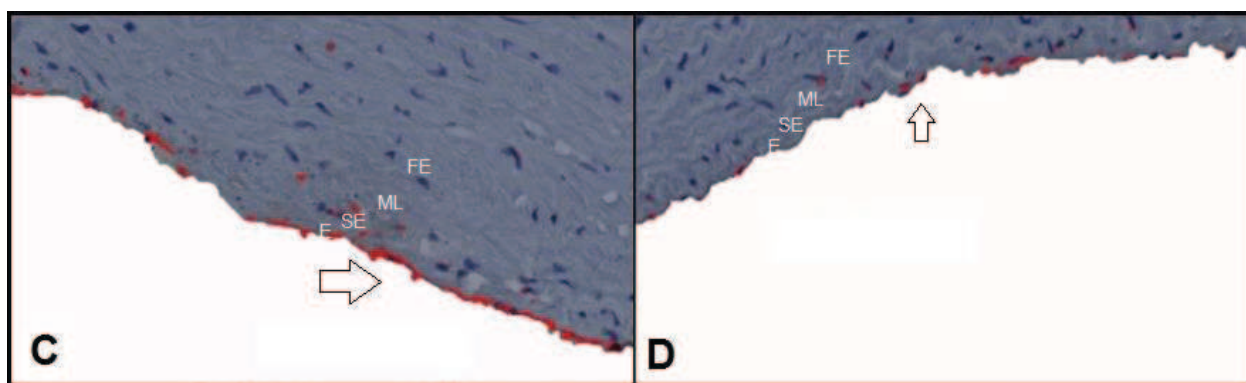
O G3, alimentado com chia, evidencia os menores valores se comparados com os outros grupos, porém sem apresentar números que corroborem com esta diferença, conforme o gráfico 1.

Grafico 01: Valores médios do níveis de ICAM quando analisada as médias dos pontos das artérias dos animais em cada grupo



A figura a seguir, apresenta a imagem imunohistoquímica de ICAM do corte na aorta, os destaques evidenciam a inflamação na camada do endotélio, demonstrando-se aumentada no quadro C(G2), em relação ao quadro D (G3).

Figura 05. Cortes histológicos da aorta



Cortes histológicos na aorta : C - Grupo Hipercolesterlêmica, a seta preta indica o marcador ICAM
D - Grupo Chia, a seta preta indica o marcador ICAM E- Endotélio; SE- Subendotelial; ML - Fibras musculares lisas;
FE- Fibras elásticas

Em relação a análise imunohistoquímica do TNF- α , a tabela 11 apresenta a estatística dos valores de média, mediana, mínimo e máximo e desvio padrão. O qual aponta diferença estatística na análise do ponto quatro, aorta abdominal.

Observa-se que os valores elevados desse marcador estão no grupo que ingeriu a dieta hipercolesterolêmica (G2).

Tabela 11. Valores da média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e valor de p para os marcadores de inflamação TNF-alfa

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
NFα-Ponto 1	Controle	10	1,05	0,50	0,12	3,01	±1,06	0,865
	Colesterol	10	0,98	0,89	0,27	2,06	±0,61	
	Linhaça	9	1,07	0,59	0,16	3,29	±1,12	
	Chia	9	1,05	0,57	0,10	4,49	±1,39	
NFα-Ponto 2	Controle	10	0,99	0,82	0,17	2,14	±0,75	0,600
	Colesterol	10	0,96	0,87	0,31	1,72	±0,50	
	Linhaça	9	1,05	0,51	0,26	2,27	±0,83	
	Chia	9	0,80	0,31	0,13	2,78	±0,86	
NFα-Ponto 3	Controle	10	1,08	0,44	0,20	2,77	±1,12	0,364
	Colesterol	10	1,18	0,95	0,38	3,94	±1,02	
	Linhaça	9	1,06	0,79	0,30	2,26	±0,75	
	Chia	9	0,72	0,52	0,14	1,86	±0,65	
NFα-Ponto 4	Controle	9	0,92	0,72	0,22	1,87	±0,60	0,002
	Colesterol	10	1,71	1,78	0,89	2,58	±0,62	
	Linhaça	9	0,93	0,82	0,48	2,88	±0,75	
	Chia	8	0,58	0,54	0,12	1,03	±0,30	
NFα-Media pontos	Controle	10	0,99	0,56	0,16	2,25	±0,84	0,402
	Colesterol	10	1,21	1,06	0,55	2,30	±0,52	
	Linhaça	9	1,03	0,89	0,34	2,33	±0,74	
	Chia	9	0,78	0,54	0,24	1,78	±0,57	

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

Quando se compara os grupos dois a dois observa-se que a diferença estatística está evidenciada entre o grupo controle e colesterol (G1xG2) ($p=0,003$), o grupo Colesterol e linhaça (G2xG4) ($p=0,003$) e Colesterol e chia (G2xG3) ($p<0,001$). (Tabela 12)

Tabela 12 - Valores de p comparando os grupos dois a dois para TNF-alfa

Grupos comparados	Valor de p
	NFα-Ponto 4
Controle x colesterol	0,003
Controle x linhaça	1
Controle x chia	0,172
Colesterol x linhaça	0,003
Colesterol x chia	<0,001
Linhaça x chia	0,172

Pode-se observar essa alteração mais claramente no Gráfico 02 na figura 06.

Gráfico 02: Valores médios de TNF- α no ponto 4 das aortas dos animais em cada grupo

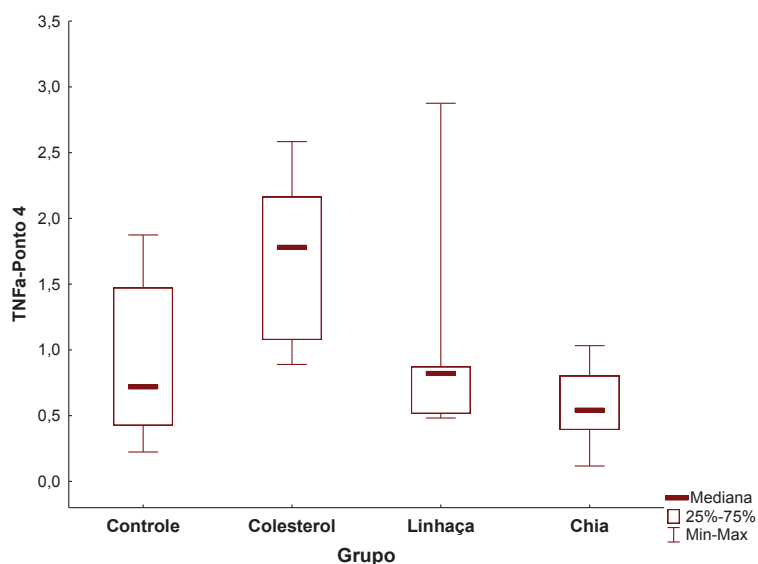
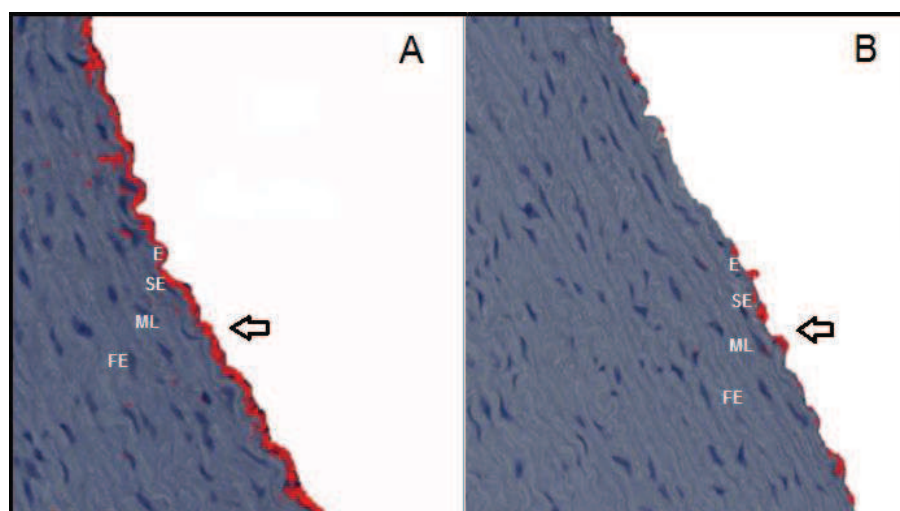


Figura 06. Cortes histológicos da aorta



Cortes histológicos da aorta abdominal. A - Grupo Hipercolesterêmica, a seta preta indica o marcador TNF- α
B - Grupo Chia, a seta preta indica o marcador TNF- α E- Endotélio; SE- Subendotelial; ML - Fibras musculares lisas;
FE- Fibras elásticas

6. DISCUSSÃO

Mediante o aumento substancial das doenças cardiovasculares e suas implicações negativas para a população, pesquisadores têm estudado estratégias para tentar reverter os danos causados ao músculo cardíaco e seu sistema de funcionamento. Neste contexto, a aterosclerose surge como uma das principais doenças cardiovasculares e por isso, para atuar em seu tratamento e prevenção, é preciso conhecer como a ela se desenvolve e então, reproduzi-la em modelos experimentais.

A forma mais utilizada para o desenvolvimento das lesões, na pesquisa com animais, é por meio da alimentação, assim a adição de colesterol em pó (Sigma Aldrich®) na ração administrada é o padrão ouro utilizado para o estudo de lesões ateroscleróticas⁹⁶. Contudo, a dificuldade na aquisição e o custo elevado, dificultam a utilização deste método. Em estudos anteriores, o desenvolvimento de dieta hipercolesterolêmica e lesões ateroscleróticas se deram, conforme o modelo de Prim et al. (2012)⁸³, pela adição de 1% de colesterol proveniente do gema de ovo liofilizado, a fim de provocar lesões que foram classificadas como de grau III⁹⁸.

Para o presente estudo utilizou-se como protocolo experimental a adição de 0,25% de colesterol, proveniente do gema de ovo liofilizado, a fim de se obter um menor grau de lesão conforme Bocan et al (1993)⁹⁹, diferentemente de estudo de Prim et al (2012)⁸³, onde desenvolveu lesões graves. A utilização dos coelhos como modelos experimentais foi muito importante pois, além de obterem um rápido desenvolvimento de lesões aórticas, possuem um baixo custo, o que proporcionou a viabilização de um modelo de ingestão de colesterol. Uma desvantagem recorrente, foi a dificuldade na obtenção dos coelhos para o experimento.

Diversos estudos em animais apontam que a ingestão de dieta com altas concentrações de lipídeos prgema de ovocam obesidade e hipercolesterolêmica, levando a diversas alterações como a lesão endotelial. Desta forma, apenas a redução lipídica na dieta reduziria os mecanismos lesivos à superfície arterial¹⁰⁰.

O foco do presente estudo pauta-se em analisar alterações bioquímicas e imunohistoquímicas, a fim de avaliar variáveis dietéticas e nutricionais. Primeiramente, aferiu-se o peso dos animais, objetivando-se a detecção de possíveis alterações entre os grupos. Observou-se que todos os grupos, obtiveram um aumento de peso, evidenciando que tanto a dieta padrão (G1) como as demais dietas, foram regularmente ingeridas, e com isso o peso dos animais foi alterado efetivamente. Estudos anteriores, denotam que dietas hiperlipidêmicas quando consumidas em longo prazo promovem o ganho de peso⁸³.

Observa-se que no G1, o qual recebeu apenas a dieta padrão, esse aumento (média ganho de peso 540g) foi ainda maior que os demais. Isso pode ser explicado pela alta palatabilidade da dieta normal. Nos grupos G2 e G3, ocorreu aumento de peso semelhante, ou seja, em média de 340 gramas. Demonstrando assim, a falta de consistência ao afirmar sobre o poder emagrecedor da farinha de Chia^{23,101}.

O grupo que ingeriu a farinha de linhaça na dieta (G4) obteve o menor aumento de peso (média 0,200g), evidenciando algumas das características da linhaça. De acordo com estudos anteriores, o consumo de 14 g de fibra/dia, por mais de 2 dias, está associado com uma diminuição de 10% no consumo de caloria levando a uma perda de peso de 1,9 Kg após 3,8 meses¹⁰². Este estudo vai de encontro a hipótese de que a ingestão da linhaça é capaz alterar favoravelmente o peso, dependendo do tempo e quantidade de ingestão.

Na sequência verificaram-se as variáveis bioquímicas através das análises séricas de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos. Sabe-se que o colesterol é um importante preditor da aterosclerose e suas concentrações podem ser modificadas através da alimentação. A cada 1% de aumento no colesterol sérico, o risco de DCV's aumenta de 2% a 3%.

No presente estudo, o grupo G1 evidenciou diminuição no colesterol total de 35,6 mg/dl para 23,64 mg/dl, porém sem significância. Tem se utilizado os alimentos funcionais, como a linhaça e chia, com o objetivo de diminuir a formação de aterosclerose e conseqüentemente, possíveis danos cardíacos. Estudos apontam que a redução do colesterol sérico em 10%, reduziu o risco de DCV's, em 5 anos, em homens entre 40 anos e 60 anos⁵³

Já nos demais grupos G2, G3 e G4 que receberam a dieta acrescida de 0,25% de gema de ovo liofilizado, os resultados para CT foram aumentados. Outros estudos experimentais corroboram com os resultados encontrados no G3, pois demonstram que o alimento funcional não alterou os níveis séricos de colesterol^{23,103-108}

O grupo linhaça (G4) não confirmou os resultados obtidos na literatura. Resultados semelhantes ao presente estudo são mais escassos, porém há artigos onde animais ingeriram a dieta a 10% de linhaça e não ocorreu nenhum efeito sobre o colesterol total¹⁰⁹. Em humanos, Stuglin e Prasad (2005) estudaram a ingestão de farinha de linhaça (40 g/dia) por mulheres durante 12 meses, não havendo diminuição neste parâmetro. Todos esses resultados controversos podem ter ocorrido devido a vários fatores como a quantidade de colesterol ingerida, a quantidade de linhaça e chia ingerida, a forma com que foram administradas (inteira ou triturada), crua ou assada e o tempo de consumo da farinha¹¹⁰.

Em seguida verificaram-se as avaliações dos níveis de LDL. No presente experimento, nenhum dos grupos apresentou resultados validados com significância estatística. Vale ressaltar que todos os grupos apresentaram valores aumentados, G1 de 8,64 mg/dl para 21,57 mg/dl, G2 de 7,83 mg/dl para 90,09mg/dl, G3 15,26mg/dl para 42,26mg/dl e G4 11,92 mg/dl para 26,95mg/dl. Quanto aos grupos G3 e G4, ao analisar sua comparação com os demais grupos, percebe-se que o aumento de LDL-C foi maior no grupo que consumiu apenas dieta hipercolesterolêmica, evidencia-se certa eficácia para farinha de chia e de linhaça, uma vez que G2 obteve um aumento de 3,2 vezes em relação a chia, e de 3 vezes em relação a linhaça.

Vuksan et al. (2007)¹⁰⁶ em seu estudo com indivíduos diabéticos verificaram que o consumo de 37g/dia de farinhas de chia, durante 12 semanas, não promoveu mudanças nos parâmetros lipídicos (colesterol total, LDL-C, HDL-C e triglicerídeos). Resultados semelhantes foram observados em indivíduos com sobrepeso e obesidade, que consumira 50 g /dia de farinhas de chia, também durante 12 semanas²³. O mesmo foi observado em relação a linhaça, onde estudo em humanos que consumiram farinha de linhaça, resultou em CT e LDL-C inalterados¹¹⁰.

Em seguida realizaram-se as análises séricas de HDL, ou seja, as lipoproteínas de alta densidade (HDL). O papel anti aterogênico da HDL tem implicações importantes para o controle das doenças cardíacas prevenindo processos inflamatórios iniciais¹¹¹.

Conhecidas como colesterol bom evidenciam-se propriedades antiaterogênicas, uma vez que desempenham um papel-chave no transporte de colesterol, inibem citocinas induzidas pela expressão de moléculas de adesão por células endoteliais e evitam a oxidação do LDL-C¹¹¹.

Sabe-se que quanto maiores os níveis de HDL-C melhor é a proteção cardíaca. Sendo assim, o objetivo é sempre o aumento desta lipoproteína. Quando analisam-se os valores de HDL-C deste estudo, observa-se que este aumento ocorreu em G1, G2 e G4. (19,29mg/dl para 21,55mg/dl; 17,15mg/dl para 48,76mg/dl; 15,79 para 28,16, respectivamente).

Particularmente no grupo G3 onde houve a ingestão de Chia, ocorreu uma diminuição de 21,01mg/dl para 14,66mg/dl, contrariando a literatura. Contudo, existem evidências que ácidos graxos insaturados alimentares, podem alterar os níveis plasmáticos de HDL-C¹¹². Em estudo de Kralova et al(2008)¹¹³, o HDL-C estava diminuído em indivíduos que consumiam uma dieta rica em ácidos graxos poli insaturados em comparação com uma dieta rica em ácidos graxos saturados. O estudo supracitado pode facilmente ser comparado ao presente experimento, pois houve a redução do HDL-C em G3.

Para finalizar as análises bioquímicas do presente estudo, verificou -se os níveis séricos de triglicerídeos. Os triglicerídeos são importantes marcadores na caracterização precoce de problemas cardíacos, pois sua concentração sérica atua como um indicador de risco de doença cardiovascular². Desta forma, sutis aumentos na concentração de triglicerídeos, elevam o risco de eventos coronarianos, progressão da doença arterial e também a formação de nova lesão. Por estes fatores, comprova-se a importância desta avaliação nos grupos estudados.

Desta forma, neste experimento o grupo G1 apresentou aumento dos triglicérides séricos de 65,30 mg/dl para 67,5mg/dl, diferença não significativa. O grupo G2, que ingeriu dieta hipercolesterolêmica, apresentou aumento dos

triglicérides em 59,5mg/dl para 64,6mg/dl. Essa também não apresentou diferença estatística significativa.

Os dados coletados no Grupo G3 apresentaram diminuição dos níveis de triglicérides, partindo de 74,67mg/dl para 34mg/dl, porém sem diferença estatística. Neste caso, apesar de não apresentar relevância estatística a ingestão de farinha de Chia, demonstrou diminuição de triglicérides sanguíneos, corroborando com os resultados de pesquisas anteriores^{47,114}

Dados semelhantes destacam-se no G4 que ingeriu farinha de linhaça, nele houve diminuição estatisticamente significativa de 79,44mg/dl para 22,50mg/dl. Este resultado denota que a administração de alimentos funcionais onde estão presentes principalmente o ω -3, fibras e lignanas, foram efetivos para promover a redução de triglicérides. Pode-se observar que a diferença estatística apresentada no grupo linhaça, está presente quando comparam-se os seus resultados com os grupos, G1 (Ração Padrão) e G2 (Dieta Hipercoleterolemica), evidenciando que a principal causa da redução de TG, ocorreu devido ao consumo de linhaça. Destaca-se estudo semelhante corroborando com este resultado. Assim como Marques *et al.* (2011)¹¹⁵ que demonstrou que o consumo de linhaça, seja como farinha crua, assada ou apenas o óleo, reduziu os níveis séricos de triglicerídeos.

A quantidade de linhaça pode ser um fator importante na diminuição dos níveis de triglicerídeos séricos, pois em estudo com humanos, a linhaça ingerida na quantidade de 20 g/dia reduziu esta análise em 36,3%¹¹⁶. Em outro estudo, a ingestão de 10% de linhaça na dieta não afetou a concentração de lipídeos séricos, mas 20% e 30% reduziram os triglicerídeos em 23%¹¹⁷. Dupasquier *et al.* (2006)¹⁰⁹ estudaram coelhos em dieta com 10% de linhaça e houve diminuição da aterosclerose por hipercolesterolemia e redução de triglicerídeos. Em outro estudo da presente linha de pesquisa, foram evidenciados dados semelhantes, apresentando-se redução nos níveis séricos de triglicerídeos⁸³. Em outro estudo mais recente⁸⁹, evidenciou diminuição dos níveis de triglicérides séricos no grupo que recebeu a farinha de linhaça.

Por outro lado, existem estudos avaliando TG que mostram resultados contraditórios, pois apresentam TG aumentado^{110,118}. Desta forma, surge a necessidade de um maior volume de estudos em modelos animais e humanos, a

fim de que se possa determinar a efetiva atuação da farinha de linhaça na redução de triglicerídeos.

Após a finalização das análises bioquímicas iniciaram-se as análises imunohistoquímicas com o intuito de determinar os processos inflamatórios. No presente estudo, avaliou-se a presença de dois marcadores, uma molécula de adesão celular (ICAM-1) e uma citocina pró inflamatória (TNF- α). Estes marcadores estão envolvidos ativamente no processo inflamatório. Além de serem variáveis mensuráveis, podem refletir a fisiopatologia de uma doença através de uma imagem tecidual, podendo auxiliar na indicação de danos e até mesmo no progresso de tratamentos¹¹⁹.

Com base na literatura, existem inúmeros estudos que utilizam como marcador inflamatório (ICAM-1), salientando para estudo anterior, onde foram utilizados sessenta coelhos, com o grupo controle com 10 animais e o grupo aterosclerótico com 50. Por meio de dieta com alto teor de gordura o grupo aterosclerótico apresentou maiores níveis de expressão de ICAM-1 na aorta do que o grupo controle ($p < 0,01$), evidenciando a atuação do ICAM como preditor de doenças cardiovasculares¹²⁰.

No presente estudo foi realizado a análise de ICAM perpassando 4 pontos da artéria de todos os animais. Os resultados evidenciaram aumento de ICAM em todos os grupos G1, G2, G3, G4 e em todos os cortes, porém sem diferença estatística entre eles. Em estudo em animais semelhante a esse realizado por Prim et al (2012)⁸³, verifica-se que os dados são semelhantes ao presente estudo para o marcador ICAM-1, pois neste estudo também não ocorreram diferenças entre os grupos. O mesmo foi observado em humanos, com a não redução significativa nos marcadores ICAM-1 e VCAM-1¹²¹.

O grupo G3 (alimentado com chia) apresentou os menores valores se comparados com os outros grupos, considerando ação anti aterogênica positiva porém sem significância. Destaca-se então, que o grupo que teve a ingestão de farinha de linhaça G4, não foi capaz de apresentar efeitos anti-inflamatórios nos animais estudados. Esses achados distintos mostram que o efeito anti inflamatório do ácido graxo ω -3 pode ser contraditório e dependente do período em que é utilizado.

O último marcador inflamatório avaliado no presente trabalho, a citocina TNF alfa, correlaciona-se com os componentes da Síndrome Metabólica podendo prever risco para doenças cardiovasculares e infarto, além de exercer papel primordial na cascata e indução da síntese de outras citocinas^{122,123}. Conforme Entman e Smith (1994)¹²⁴, tem sido demonstrado que o TNF- α é um marcador independente para infarto do miocárdio. Constatou-se, também, que a neutralização do TNF- α pode melhorar a função ventricular esquerda pós-isquemia aguda¹²³.

Ao analisar os resultados do presente estudo observa-se que houve diferença estatística entre os grupos no ponto quatro da aorta ($p=0,002$). Para verificar essa diferença comparou-se grupo a grupo, onde identificou-se diferença estatística entre o G1 e G2 ($p=0,003$), G2xG3 ($p=0,001$) e G2x G4 ($p=0,003$).

Destaca-se o grupo controle G1 que não ingeriu dieta hipercolesterolêmica, porém a média dos níveis de TNF- α estão acima do G3 e G4, porém sem significância. Contudo, fica evidente que os valores de TNF- α estão aumentados no G2, dando suporte a afirmação de que estes marcadores estão associados a fatores de estresse e inflamação. Observa-se isso em estudo com pessoas com excesso de peso ($IMC > 27 \text{ kg/m}^2$), que os valores séricos de TNF- α e de TNFR-2 foram significativamente mais elevados que em pessoas com peso normal ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$)²⁸. Assim como no estudo CARE, onde verificou-se que níveis elevados de TNF- α estavam associados a eventos coronarianos recorrentes em pacientes pós- IAM¹²⁵.

Em relação aos alimentos funcionais, o TNF- α , apresentou resultados diminuído nos dois grupos, G3 e G4, caracterizando resultado estatisticamente significativo, favorecendo a hipótese de que os componentes da linhaça e da chia estão associados a diminuição das atividades anti inflamatórias e anti aterogênicas.

Após intensa revisão de literatura não foram encontrados experimentos relacionando estes marcadores com a farinha de Chia, principalmente por ser um alimento análogo de ovo, ainda pouco estudado. Pode-se afirmar também, que ocorreu a diminuição do marcador imunohistoquímico TNF α , que neste estudo, foi estatisticamente significativa e serve para ressaltar a relevância deste resultado pelo caráter de ineditismo.

No grupo G3, destaca-se que houve diminuição de triglicérides na amostra sanguínea, dados comprovados estatisticamente, os resultados obtidos no grupo G3 caracterizam, de fato, o retardo do agravamento da lesão, quando compararam-se os resultados do G3, com o grupo G1 e G2. Pode-se verificar também que ocorreu a diminuição do marcador imunohistoquímico TNF- α , fato demonstrado pela primeira vez.

Quanto ao G4, estudos onde adicionaram a linhaça na dieta e utilizaram a análise de TNF- α , puderam servir de suporte aos achados positivos no presente estudo. Cassini et al (2015)⁸⁹ apresenta de forma clara a diminuição nos marcadores inflamatórios (PCR e TNF- α) no grupo que recebeu 60g/ dia de linhaça. Para Baranowski et al (2012)¹²⁶ a adição de óleo de linhaça na dieta teve um efeito marcante sobre a MCP-1 e TNF- α no tecido adiposo de ratos, reduzindo níveis destas citocinas pró-inflamatórias. Para concluir em estudo de Grunfeld (1991)¹²⁷, apresentou níveis aumentados de TNF α na maioria dos pacientes, os quais tenderam a diminuir após a utilização do ω -3.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na bibliografia consultada e mediante resultados obtidos através deste experimento, observa-se a incidência de diminuição do processo aterosclerótico nos dois grupos onde foram testadas dietas com os alimentos funcionais, Farinha de Chia e e Farinha de Linhaça.

Comparando os grupos que receberam adição do das farinhas de chia e linhaça, observamos que os resultados foram semelhantes, sendo que em G3 e G4 destacam-se por uma diminuição de triglicérides, assim como a diminuição dos níveis imunohistoquímicos de $TNF\alpha$, fato este que ratifica estudos anteriores que destacam a forte tendência das farinhas em atuar de forma efetiva na diminuição dos níveis de $TNF-\alpha$ e com isso evitar com que a lesão e desenvolvimento da placa aterosclerótica ocorra na camada íntima da artéria coronariana.

Contudo, inúmeras diferenças podem surgir quando se alteram os protocolos de estudo de um experimento, por isso, sugere-se um maior número de pesquisas envolvendo uma comparação direta entre estas farinhas funcionais.

CONCLUSÃO

Após análise criteriosa dos dados obtidos no presente trabalho observou-se que o presente estudo obteve sucesso ao avaliar os efeitos da farinha de linhaça e chia na aterogênese de coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica a 0,25% de gema de ovo liofilizado, resultado este, que corroborou com as expectativas impostas no objetivo geral.

De forma mais específica, os resultados obtidos atingiram os objetivos de forma satisfatória, onde destacam-se :

Após alimentar coelhos com dieta hipercolesterolêmica acrescida com farinha de chia e linhaça, observou-se que os animais apresentaram aumento de colesterol em relação ao grupo controle, sendo efetiva a dieta proposta no início da investigação. Quanto ao perfil lipídico, observou-se que os grupos que ingeriram as farinhas, apresentaram redução do triglicerídeos comprovando a eficácia das Farinhas de Chia e de Linhaça. Quanto as avaliações histológicas e imunohistoquímicas das aortas dos quatro grupos estudados, observou-se alterações significativas, apenas nas avaliações imunohistoquímicas as quais foram submetidos os grupos G3 e G4. Ou seja, os grupos onde foram adicionadas farinha de chia e linhaça, apresentaram redução do marcadores inflamatórios TNF α , comprovando a eficácia destes alimentos funcionais para proteção às doenças ateroscleróticas.

E por fim, em comparação, os resultados obtidos com animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica com farinhas de chia e linhaça, não apresentaram diferenças, por isso, observa-se a necessidade de novos estudos fazendo a comparação entre elas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Oliveira Jr. MT, Canesin MF, Marcolino MS, Ribeiro ALP, Carvalho ACC, Reddy S et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz de Telecardiologia no Cuidado de Pacientes com Síndrome Coronariana Aguda e Outras Doenças Cardíacas. Arq Bras Cardiol 2015; 104(Supl.1): 1-26.
- 2- Xavier HT. Izar MC. Faria Neto JR. Assad MH, Rocha VZ. Sposito AC. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq Bras Cardiol. 2013; 101(4Supl.1): 1-22.
- 3- Brasil. Ministério da Saúde (MS). Prevenção Clínica de Doenças Cardiovascular, Cerebrovascular e Renal Crônica. Brasília: Ministério da Saúde (MS); 2006.
- 4- American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics-2009 Update. Dallas, Texas: American Heart Association; 2009.
- 5- IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq. Bras. Cardiol. [periódico na Internet] 2007. Acesso em: 05 de novembro de 2015. vol.88, suppl.1, pp. 2-19. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2007/diretriz-DA.pdf>
- 6- Braga ADA, Barleta VCN. Alimento Funcional: Uma Nova Abordagem Terapêutica das Dislipidemias como Prevenção da Doença Aterosclerótica. Cadernos UniFOA 2007; 2(3): 1-28.
- 7- Stabelini NA, Bozza R, Ulbrich AZ et al. Fatores de risco para aterosclerose associados a aptidão cardiorrespiratória e ao IMC em adolescentes. Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52(6): 1024-30.
- 8- Schoenhagen P, Tuzcu EM. Métodos por imagem da aterosclerose em estudos de progressão/regressão: marcador substituto ou janela direta para o processo patológico da aterosclerose?. Arq Bras Cardiol 2008; 91(6): 418-31.
- 9- Castro PSG, Oliveira FLC. Prevenção da aterosclerose e tratamento medicamentoso de anormalidades lipídicas de alto risco em crianças e adolescentes. J Pediatr (Rio J) 2009; 85(1): 6-14
- 10- Anjo CFD. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. J Vasc Br . [periódico na Internet] 2004. Acesso em: 05 de novembro de 2015. Vol. 3, Nº2. Disponível em: <http://jornalvascularbrasileiro.com.br/04-03-02/04-03-02-145/04-03-02-145.pdf>
- 11- Badimon L. Gemma V, Padro T. Nutraceuticals and Atherosclerosis: Human Trials. Cardiovascular Therapeutics 2010; vol 28:202-215.

- 12- Magalhães ME, Brandão AA, Freitas EV, et al. Novas perspectivas no tratamento das dislipidemias. *Revista da SOCERJ* 2004; 17(2): 105-11.
- 13- Dodin S, Lemay H, Jacques F, et al. The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women: a randomized, double-blind, wheat germ placebo-controlled clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 90(3): 1390-1397.
- 14- Tarpila, S. Aro, A. Salminen, I. Tarpila, A. et al. The effect of flaxseed supplementation in processed foods on serum fatty acids and enterolactone. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.56, n.2, p.157–165, 2002.
- 15- Delmas D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(5): 377-395.
- 16- Haper CR, Edwards MJ, DeFillips AP, et al. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *J Nutr* 2006; 136(1): 83-87.
- 17- Oomah, BD. Der, TJ. Godfrey, DV. Thermal characteristics of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. *Food Chemistry*, v.98, n.4, p.733–741, 2006.
- 18- Peiretti P.G, Gai. F. Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispânica* L.) seeds and plant during growth / *Animal Feed Science and Technology* 148 (2009) 267–275.
- 19- Tosco, G. Os benefícios da “chia” em humanos e animais. *Atualidades ornitológicas*, 2004 n 119:7.
- 20- Opinion on the safety of Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seeds' as a food ingredient. Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *The EFSA Journal* (2009) 996, 1-26.
- 21- Ayerza, R. Coates W. Dietary levels of chia: influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition, for two strains of hens. *Poultry Science*, 2000. 78:724-739.
- 22- Chicco, GA. D'Alessandro, EM. Hein, JG. et al. Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *British Journal of Nutrition*. 2008.101:41–50.
- 23- Nieman CD, Cavea JE, Austin DM et al. Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adult, 2009.
- 24 -Uauy R, Valenzuela A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, New York. 2000. 16(7/8): 680-84.

- 25-Hennig B, Toborek M. Nutrition and endothelial cell function: implications in atherosclerosis. *Nutrition Research*. 2001. 21(1): 279-93.
- 26- Girollo M, Alves AS, Baptista F. Doença aterosclerótica: uma patologia multifatorial. *SaBio-Rev. Saúde e Biol*, 2007. 2:1, 32-41.
27. Libby MP. The risk of atherosclerosis: the role of high density lipoprotein. *Am J Cardiol* 88(12A):3N-8N, 2001.
- 28- Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26, 1999.
- 29- Mendonça Filho HTF. Choque Cardiogénico e inflamação. *Rev SOCERJ*;14(2).2001.
- 30- Araya H, Lutz MR. Alimentos funcionales y saludables. *Rev Chil Nutr* 30(1):8-14, 2003.
- 31- Sgarbieri, VC. PACHECO, MT. Alimentos Funcionais Fisiológicos. *Brazilian Journal of food technology*, 2 (1,2) 7-19, 1999.
- 32- Kwak N, Junkes DJ. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control* 12(2):99-107, 2001.
- 33- Borges, VC. Alimentos funcionais: Prébióticos, Probióticos, Fitoquímicos e Simbióticos. Em WAITZBERG, D.L., Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p.1495-1509, 2006.
- 34- Padilha, PC. Pinheiro, RL. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 50(3), p. 251 – 260. 2004.
- 35- Portaria n. 398, de 30 de Abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 03 de maio de 1999. Disponível em: http://www.crn6.com.br/LEGISLACAO_%20ALIMENTACAO_E_%20NUTRICAO/portaria/Portaria%20ANVISA%20398-1999%20Rotulagem%20de%20alimentos.pdf Data de acesso: 10/09/2015.
- 36- Salgado, JM. Faça do alimento seu medicamento. São Paulo: Madras, 2000. 173p.
- 37- Abia, Associação brasileira das indústrias da alimentação. Ritmo de crescimento de alimentos funcionais acelera no Brasil. Agosto de 2011. Acesso em: 24 de novembro de 2015. Disponível em: <http://empreendedor.com.br/pt-br/categorias/agronegocio/artigos/ritmo-de-crescimento-de-alimentos-funcionais-acelera-no-brasil>.

- 38- Borneo, R. Aguirre, A. León, A. E. Chia (*Salvia hispanica* L) Gel Can Be Used as Egg or Oil Replacer in Cake Formulations. Journal of the American Dietetic Association. v.10, p. 946-949, 2010.
- 39- Ixtaina, VY. Susana M. Nolascoa, Mabel C. Tomas M. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Industrial crops and products, v. 28, p. 286–293, 2008.
- 40- EFSA. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to the safety of chia (*Salvia hispanica* L.) seed and ground whole chia seed as a novel food ingredient intended for use in bread. The EFSA Journal, 2005, 278 p
- 41- Muñoz, LA. Cobos A. Diaz O. Aguilera, JM. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. Journal of Food Engineering, v. 108, p. 216–224, 2012.
- 42- Coelho MS. Salas-Mellado, M M. Chemical Characterization of Chia (*Salvia hispanica* L.) for Use in Food Products. Journal of Food and Nutrition Research, v. 2, n. 5, p. 263-269, 2014. <http://dx.doi.org/10.12691/jfnr-2-5-9>.
- 43- Va'zquez-Ovando, A Rosado-Rubio, G. Chel-Guerrero, L. Betancur-Ancona, D. Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). Food Science and Technology, v. 42, p. 168–173, 2009.
- 44- Ayerza R. Coates W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). Industrial Crops and Products, v. 34, p. 1366– 1371, 2011.
- 45- Reyes-Caudillo E. Tecante A. Valdivia-Lopez MA. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Food Chemistry, v. 107, p. 656–663, 2008.
- 46- Poudyal, H. Panchal, SK. Waanders J. Ward, L. Brown, L. Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. Journal of Nutritional Biochemistry, v. 23, p. 153–162, 2012.
- 47- Ayzera R. Coates W. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. Nutrition Research, v. 25, p. 995–1003, 2005
- 48- DeFilippis AP, Blaha MJ, Jacobson TA. Omega-3 Fatty Acids for Cardiovascular Disease Prevention. Curr Treat Options Cardiovasc Med 12:365–380, 2010.
- 49- Santos, RD. Gagliardi, ACM. Xavier HT. Magnoni, CD. Cassani, R.; Lottenberg AMP. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 100, Supl. 3, p. 1-40, 2013.

- 50- Taneja A, Singh H. Challenges for the Delivery of Long-Chain ω -3 Fatty Acids in Functional Foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol* 3:105–23, 2012.
- 51-Zhao G, Etherton TD, Martin KR. et al. Dietary α - linolenic acid reduce inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr* 134:2991-7, 2004.
- 52- Jin, F. et al. Supplementation of Milled Chia Seeds Increases Plasma ALA and EPA in Postmenopausal Women. *Plant Foods Human Nutrition*, v. 67, n.2, p.105-110, 2012
- 53- Prasad K. Flaxseed and Cardiovascular Health. *J Cardiovasc Pharmacol* 54(5): 369-77, 2009.
- 54- Araújo LMB, Britto MMS, Cruz TRP. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 44(6): 506-518, 2000.
- 55- Epaminondas, PS. Caracterização físico-química e termo oxidativa das farinhas de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e de seus óleos. 2009. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- 56- Morris, DH. Descripción y Composición de la Linaza. *Linaza - Una Recopilación sobre sus Efectos em la Salud y Nutrición*. CANADA, F.C.O.p. 9- 21, 2007.
57. Araújo LMB, Britto MMS, Cruz TRP. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 44(6): 506-518, 2000.
- 58- Gonçalves MCR, Costa MJC, Ascitti LSR, et.al. Fibras dietéticas solúveis e suas funções nas dislipidemias. *Rev Bras Nutr Clin* 22(2):167-73, 2007.
- 59- López G, Ros G, Rincón F, et.al. Propiedades funcionales de la fibra dietética: mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal. *Arch Lat Am Nutr* 47(3):203-206, 1997.
- 60- Costa RP, Silva CC. Doenças Cardiovasculares. In: Cuppari L. Guias de nutrição: nutrição clínica no adulto. Barueri, 2005.
- 61- Simões, CMO. Schenkel, EP. Gosmann, G. Mello, JCP. Mentz, LA. Petrovick, PR. Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000. 1104 p. PMCID:PMC2620449
- 62- Dorman, HJD. Kosar, M. Kahlos, K. Holm, Y. Hiltunen, R. Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from Mentha Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003. PMID:14705878. <http://dx.doi.org/10.1021/jf034108k>.

- 63- Manach, C. Mazur, A. Scalbert, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2005
- 64- Puupponen-Pimiä, R. et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001
- 65- Ixtaina, VY. Martínez, ML. Spotorno, V. Mateo, CM. Maestri, DM.; Diehl, BWK. Characterization of Chia Seed Oils Obtained by Pressing and Solvent Extraction. *Journal of Food Composition Analysis*, San Diego, v. 24, n. 2, p. 166-174, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.08.006>.
66. Novello D, Pollonio MA. Caracterização e Propriedades da Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e Subprodutos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* 29(2): 317-30, 2011.
- 67- Austria JA, Richard MN, Chahine MN, et.al. Bioavailability of Alpha-Linolenic Acid in Subjects after Ingestion of three different forms of Flaxseed. *J Am Coll Nutr* 27(2): 214–221, 2008.
- 68- Carter, JF. Potential of flaxseed and flaxseed oil in baked goods and other products in human nutrition. *Cereal Foods World*, n. 10, p. 753-759, 1993.
- 69- Sammour, RH. Proteins of linseed (*Linum usitatissimum* L.), extraction and characterization by electrophoresis. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v. 40, n. 2, p. 121-126, 1999
- 70- Monego, MA. Goma da Linhaça (*Linum usitatissimum* L.), para uso como hidrocolóida na Indústria alimentícia. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- 71- Molena-Fernandes, CA. Schimidt, G. Neto-Oliveira, ER. Bersani-Amado, CA. Cuman, RKN. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.12, n. 2, p. 201-207, 2010.
- 72- Trucom, C. A importância da linhaça na saúde. 1. ed. São Paulo: Alaúde, 2006, 144p.
- 73- Flax council of canada. Statistics. 2012. Disponível em: <<http://www.flaxcouncil.ca>>. Acesso em: 14 mar. 2015.
- 74- Bathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* 76:1191 – 1201, 2002.
75. Epaminondas PS, Araújo KL, Souza AL, et.al. Influence of toasting on the nutritious and thermal properties of flaxseed. *J Therm Anal Calorim* [internet] 2011

mai [acesso em 11 de março de 2016]. Disponível em: <http://www.akademai.com/content/d1k611417867rk08/>.

76- Oomah BD. Flaxseed as a functional food source. *J Sci Food Agric* 81:889-894, 2001.

77- Galvão, EL. Silva, DCF. Silva, JO. Moreira, AVB. Sousa, EMBD. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 3, p. 551-557, 2008.

78- Maciel, LMB. Pontes, DF. Rodrigues, MCP. Efeitos da adição de farinha de linhaça no processamento de biscoito tipo cream craker. *Alimentos e Nutrição*, v. 19, n. 4, p. 385-92, 2008.

79-Zheng, Y. Weisenborn, DP. Tostenson, K. Kangas, N. Energy analysis in the screw pressing of whole and dehulled flaxseed. *Journal of Food Engineering*, v. 66, n. 2, p. 193-202, 2005.

80- Kasote, D.M. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *International Food Research Journal*, n. 20, p. 27-34, 2013.

81-Conforti FD, Cachaper KF. Effects of selected antioxidants on physical and sensory characteristics of yeast bread containing flaxseed meal. *Int J Consum Stud* 33: 89–93, 2009

82- Vijaimohan, K. Jainu, M. Sabitha, KE. Subramaniam, S. Anandhan, C. Shyamala devi, CS. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Sciences*, v.79, n.5, p.448-54, 2006.

83- Prim, CR. Baroncinl, LAV. Precoma, LB. Caron, PHL.; Winter, G. Polettl, MOD. Precoma, .B. Effects of linseed consumption for a short period of time on lipid profile and atherosclerotic lesions in rabbits fed a hypercholesterolaemic diet. *British Journal of Nutrition*, v. 107, p. 660-664, 2012.

84- Pan, A. Yu, D Demark-Wahnefried, W. Franco, OH. Lin, X. Metaanalysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 90, p. 288-297, 2009.

85- Prasad, K. Hypocholesterolemic and anthiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis*, v. 179, n. 2, p. 269-275, 2005.

86-Oliveira, CG. Absorção de macronutrientes e de energia em indivíduos saudáveis após o consumo de linhaça e derivados. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006

- 87- Prasad K, Mantha SV, Muir AD, et.al. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low α -linolenic acid. *Atherosclerosis* 136(2): 367–375, 1998
- 88- Patade A, Devareddy L, Lucas EA, et.al. Flaxseed reduces total and LDL cholesterol concentrations in Native American postmenopausal women. *J Women Health* 17:355–366, 2008.
- 89-Cassani, RSL. Linhaça e lignanas: efeito do consumo sobre indicadores nutricionais e inflamatórios. 2009. 215f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.
- 90-Gomes, IF. Frade, RET. Moura, AF. Poltronieri, F. Papel dos compostos bioativos da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) no câncer. *Nutrição Brasil*, v. 11, n. 1, p. 48-55, 2012.
- 91-Cordeiro, R. Fernandes, PL. Barbosa, LA. Farinha de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n. 3, p. 727-732, 2009.
- 92-Adolphe, JL. Whiting, SJ. Juurlink, BHJ. Thorpe, LU. Alcorn, J. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *British Journal of Nutrition*, n. 103, p. 929-938, 2010.
- 93-Peterson, J. Dwyer, J. Adlercreutz, H. Scalbert, A. Jacques, P. McCullough, M.L. Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews*, v. 68, n. 10, p. 571- 603, 2010.
- 94-Westcott ND, Muir AD. Flax seed lignan in disease prevention and health promotion. *Phytochem Rev* 2(3): 401-417, 2003.
- 95- Touré A, Xueming X. Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety* 9: 261-269, 2010.
- 96- Précoma DB, Noronha L, Moura AV, et al. Radiolesão vascular como efeito deletério da braquiterapia intra-arterial com dose elevada de samário-153 em coelhos hipercolesterolêmicos. *Arq Bras Cardiol* 87(4): 512-19, 2006.
- 97- Alessi A, França Neto OR, Précoma DB, et. al. Use of rosiglitazone before and after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: Assessment of neointimal formation. *Thromb J* 6:12, 2008.
- 98- Kritchevsky D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis:a review of the early history. *J Nutr.* 1995;125:589S-93S.

99- Bocan TM, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis*. 1993;102:9-22.

100- Martins, F. Campos, S.H.D. Pagan, U.L et al. Dieta Hiperlipídica Promove Remodelação Cardíaca em Modelo Experimental de Obesidade *Arq Bras Cardiol*. 105(5):479-486, 2015.

101-Brissette, C.E. et al. The effect of *Salvia hispanica* L. seeds on weight loss in overweight and obese individuals with type 2 diabetes mellitus. *Canadian Journal of Diabetes*, v.37,p.S13-S84,2013.

102- IMeN - Instituto de Metabolismo e Nutrição, 2005. Fibras na Nutrição Humana - Aplicações Clínicas: Obesidade. Disponível em: <http://www.nutricaoclinica.com.br> , acesso em: 28 de janeiro de 2015

103-. Kris-Entherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106:2747-2757, 2002.

104- Jenkis DJA, Kendall CWC, Marchie, A. et al. Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors : blood lipids, oxidized low – density lipoproteins, lipoprotein(a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: a randomized, controlled, crossover trial. *Circulation* 106:1327-1332, 2002.

105. Lucas EA, Lightfoot SA, Hammond LJ. et al. Flaxseed reduces plasma cholesterol and atherosclerotic lesion formation in ovariectomized Golden Syrian Hamsters. *Atherosclerosis* 173:223-229, 2004.

106- Vuskan, V. Whitham, D; Sievenpiper, J.L; Jenkins, A.L; Rogovik, A.L; Bazinet, R.P; Vidgen, E; Hanna, A. Supplementation of conventional therapy with the novel grain Salba (*Salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: results of a randomized controlled trial. *Diabetes Care*. Toronto, v.30, n.11, p. 2804-2810, 2007.

107. Shakir KAF, Madhusudhan B. Hypocholesterolemic and hepatoprotective effects of flaxseed chutney: Evidence from animal studies. *Indian J Clin Biochem* 22(1):117-121, 2007.

108- Nieman, DC. Gillitt, N. Jin, F. Henson, DA. Kennerly, YK. Shanely, R.A; Ore, B. Su, M. Schwartz, S. Chia seed supplementation and disease risk factors in overweight women: a metabolomics investigation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, Kannapolis, v.18, n.7, p.700-708, 2012.

109-. Dupasquier CH, Weber AM, Ander BP. et al. Effects of dietary flaxseed on vascular contractile function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2987-H2996, 2006.

110. Stuglin C, Prasad K. Effect of flaxseed consumption on blood pressure, serum lipids, hemopoietic system and liver and kidney enzymes in healthy humans. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 10(1):23-7, 2005.
- 111-Dodin S, Cunnane SC, Mâsse B. et al. Flaxseed on cardiovascular disease marker in healthy menopausal women: a randomized, double – blind, placebo – controlled trial. *Nutrition* 24:23-30, 2008.
112. Lee J, Park Y, Koo SI. ATP-binding cassette transporter A1 and HDL metabolism: effects of fatty acids. *J Nutr Biochem* 23:1–7, 2012.
113. Kralova LI, Suchanek P, Kovar J, et al. Replacement of dietary saturated FAs by PUFAs in diet and reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 49:2414–8, 2008.
- 114- Hernández-Viveros, M. Guevara-Cruz, M. Ovar, AR. Aguilar-Salinas, CA. Medina-Vera, I. Gil-zenteno, et al. A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *Journal of Nutrition*, v.142, n.1, p.64-69, 2012.
- 115- Marques AC, Hautrive TP, Moura GB, et.al. Effect of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) prepared by different methods on the biological response of rats. *Rev Nutr* 24(1):131-141, 2011.
- 116 Mandasescu S, Mocanu V, Dascalita AM. et al. Flaxseed supplementation in hyperlipidemic patients. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 109(3):502-6, 2005
- 117- Ratnayake WMN, Behrens W, Fischer P. Chemical and nutritional studies of flaxseed (variety Linott) in rats. *J Nutr Biochem* 3:232-240, 1992.
- 118- WEST, S. G. et al. Effects of including soy protein in a 35. blood cholesterol-lowering diet on markers of cardiac risk in men and in postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *J. Women's Health*, abr.2005, p. 253-262. Disponível em: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jwh.2007.0359>. Acesso em: 23 janeiro. 2015.
- 119-Casella Filho A, Araújo RG, GalvãoTG, et al. Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Ngema de ovos Marcadores. *Rev Bras Cardiol Invas* 11(3): 14-19, 2003.
- 120- Li M, Wang X, Yang L, et al. Psychological stress increases expression of aortic plaque intercellular adhesion molecule-1 and serum inflammatory cytokines in atherosclerotic rabbit model. *J Geriatr Cardiol* 5(4):235-242, 2008.
- 121- Abe Y, El-Masri B, Kimball KT. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 18:723-731, 1998.

122. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000;102:3060-7.

123- Francisco G, Hernández C, Simó R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipidemia. *Clin Chim Acta*. 2006;369:1-16.

124- Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994;28(9):1301-11.

125- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:2149–53.

126- Baranowski, M. Jennifer Enns, J. b,c,1 , Heather Blewett, H, et al . Dietary flaxseed oil reduces adipocyte size, adipose monocyte chemoattractant protein-1 levels and T-cell infiltration in obese, insulin-resistant rats .*Cytokine* 59 (2012) 382–391

127- Grunfeld C, Kotler DP, Shigenaga JK, et al. Circulating interferon- α levels and hypertriglyceridaemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*.1991;90:154-62

ANEXOS

1. Parecer CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 30 agosto de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 720 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Estudo anatomopatológico e imunohistoquímico dos efeitos da linhaça e da semente de cheia no processo aterosclerótico na aorta de coelhos submetidos á dieta hipercolesterolêmica com ovo liofilizado a 0,25%

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dalton Bertolim Précoma

EQUIPE DE PESQUISA:

Dalton Bertolim Précoma, Maynara Schuh, Ana Carolina Gradowski, Ana Flávia Champoski

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Medicina / Escola de Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Coelhos	Macho	4 meses / 1,5kg	B	40

O colegiado do CEUA em reunião no dia 30/08/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

